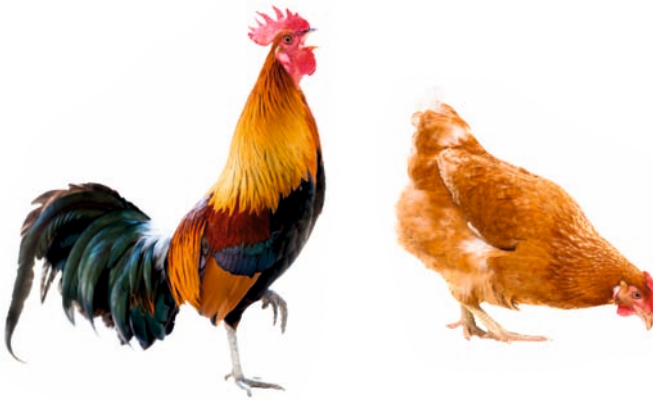


Entwicklung und Etablierung von Spermienfunktionstests beim Vogel



JUDITH KROHN



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie
und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

Entwicklung und Etablierung von Spermienfunktionstests beim Vogel

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr.med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Judith Krohn

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. M. Lierz

Tag der Disputation: 18.01.2016

Teile und Auszüge aus der Arbeit sind folgendermaßen publiziert:

- Krohn, J.; Meinecke-Tillmann, S.; Schneider, H.; Lierz, M.; Wehrend, A.; (2012):
Technical Note: Investigations on the accomplishment of the avian perivitelline
membrane penetration assay

Reproduction in Domestic Animals Suppl. 2, 47:33

- Krohn, J.; Schneider, H.; Meinecke-Tillmann, S.; Fischer, D.; Ehling, C.; Lierz,
M.; Wehrend, A. (2014): Technical Note: In vitro examination of the penetration
ability in avian spermatozoa of different species

Reproduction in Domestic Animals Suppl. 1, 49: 29-30

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Befruchtung beim Vogel	3
2.2	Spermienfunktionstests beim Vogel.....	4
2.2.1	Perivitellinmembran-Penetrationstest	4
2.2.2	Sperm Quality Index	6
2.2.3	Sperm-Mobility-Assay	7
2.2.4	Hypo-osmotischer Schwelltest.....	8
2.2.5	Tetrazolium-Reduktionstest	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Versuch 1: Präparationsmodifikation	11
3.1.1	Eier	11
3.1.2	Präparation der Perivitellinmembran	12
3.1.2.1	Protokoll I	12
3.1.2.2	Protokoll II	14
3.1.2.3	Protokoll III	14
3.1.2.4	Protokoll IV	14
3.1.3	Färbung	15
3.1.4	Auswertung	15
3.2	Versuch 2: Haltbarkeitsstudie	15
3.3	Versuch 3: Bebrütungsversuch	16
3.4	Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Vogelspezies	17
3.5	Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest	17
3.5.1	Nativsperma Hahn	18
3.5.2	Tiefgefrier-Sperma Hahn	20
3.5.3	Nativ-Sperma Nymphensittich	20
3.5.4	Nativ-Sperma Falke	21
3.6	Statistische Auswertung	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Versuch 1: Präparationsmodifikation	24
4.2	Versuch 2: Haltbarkeitsstudie	24
4.3	Versuch 3: Bebrütungsversuch	25

4.4	Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Vogelspezies	27
4.5	Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest	28
4.6	Vergleich der Spezies	34
5	Diskussion.....	35
5.1	Diskussion der Fragestellung.....	35
5.2	Diskussion der Methode	36
5.2.1	Versuch 1: Präparationsmodifikation	36
5.2.2	Versuch 2: Haltbarkeitsstudie	37
5.2.3	Versuch 3: Bebrütungsversuch.....	37
5.2.4	Versuch 4: Bebrütung von Eiern anderer Spezies.....	38
5.2.5	Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest.....	38
5.3	Diskussion der Ergebnisse	39
5.3.1	Versuch 1: Präparationsmodifikation	39
5.3.2	Versuch 2: Haltbarkeitsstudie	39
5.3.3	Versuch 3: Bebrütungsversuch.....	40
5.3.4	Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Vogelspezies	41
5.3.5	Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest.....	41
5.4.	Schlussbetrachtung	42
6	Zusammenfassung.....	44
7	Summary.....	46
8	Literaturverzeichnis	48
9	Anhang.....	54
9.1	Versuch 1: Präparationsmodifikation	54
9.2	Versuch 2: Haltbarkeitsstudie	56
9.3	Versuch 3: Bebrütungsversuch.....	59
9.4	Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Spezies	68
9.5	Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest	75
9.6	Tabellenverzeichnis	83
9.7	Abbildungsverzeichnis	85

1 Einleitung und Fragestellung

In der Spermatologie der Haussäugetiere sind die diagnostischen Verfahren seit Jahren etabliert und es liegt bereits eine Vielzahl funktioneller Tests vor. Für Vögel sind entsprechende Verfahren bisher nur experimentell angewendet worden und befinden sich noch nicht in der praktischen Anwendung.

Ziel der Arbeit ist es, einen modifizierten Perivitellinmembran-Penetrationstest als Spermienfunktionstest beim Vogel zu etablieren und zu überprüfen, ob dieser spezieübergreifend eingesetzt werden kann. Der Fokus der Arbeit wird auf Untersuchungen mit dem Sperma von Falken und Papageien gerichtet sein. Dabei handelt es sich um wertvolle und zum Teil seltene Arten, deren Fortpflanzungsfähigkeit sowohl unter dem Aspekt der Arterhaltung, als auch im Bezug auf eine Nutzung der Tiere durch den Menschen, von gesteigertem Interesse ist. Da gerade bei Vögeln, die in Gefangenschaft gehalten werden häufig Fortpflanzungsdefizite vorliegen, spielt auch die artifizielle Samenübertragung eine nicht unerhebliche Rolle (Blanco et al. 2009). Vor der Übertragung einer Samenportion auf das weibliche Tier ist eine Überprüfung der Spermaqualität sinnvoll. Liegen nachweislich Mängel hinsichtlich der Fruchtbarkeit vor, sind weitergehende Tests notwendig, um die Stufe im Fortpflanzungsprozess herausfinden zu können, auf der es zur Unterbrechung der physiologischen Abläufe kommt.

Wenn es gelingt, die Interspezies-Interaktion zwischen der inneren Perivitellinmembran (IPVM) des Huhns und den Spermien von Falken bzw. Papageien nachzuweisen, könnte ein Perivitellinmembran-Penetrationstest als Funktionstest für Falken- und Papageiensperma mit Hühnereiern durchgeführt werden. Der entscheidende Vorteil dieses Versuchsaufbaus wäre, dass kein potentiell befruchtungsfähiges und damit wertvolles Falken- oder Papageien-Ei für den Test verwendet werden müsste.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist daher, einen solchen Perivitellinmembran-Penetrationstest zu entwickeln. Dazu soll die innere Perivitellinmembran aus Hühnereiern isoliert und mit Spermien von Falken und Papageien inkubiert werden. Anhand der Löcher, die durch die Hydrolyse der Spermien entstehen, könnte die Penetrationsfähigkeit der Spermien ermittelt werden.

In einem ersten Versuchsdurchgang soll eine stabile Methode zur Separation der inneren Perivitellinmembran entwickelt werden, deren Anwendbarkeit auch an Eiern

anderer Vogelspezies geprüft wird. Außerdem soll der Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Separationseigenschaften der Eier untersucht werden. Im Anschluss daran werden Penetrationsversuche mit Hühnereiern und Falken- bzw. Papageiensperma durchgeführt.

2 Literatur

2.1 Befruchtung beim Vogel

Die Befruchtung des Vogeis findet vor der Eiablage im weiblichen Genitaltrakt statt. Bei der Kopulation kommt es zur Aufnahme von Spermien in die Vagina des weiblichen Tieres. Der Hauptteil der Spermien wandert direkt in den Eileiter. Ein geringer Teil der Spermien wird in tubuläre Samenspeicherdrüsen aufgenommen, die sich am Übergang vom Uterus zur Vagina befinden. Das Haushuhn besitzt bis zu 25.000 Samenspeicherdrüsen, in denen 7-10 Prozent der aufgenommenen Spermien gespeichert werden können (Gerstberger & Barth 2005). In den Samenspeicherdrüsen sind die Spermien für mehrere Tage bis Wochen überlebensfähig und können die in diesem Zeitraum ovulierenden Eizellen befruchten. Die Länge der fertilen Periode der Samenzellen variiert in Abhängigkeit von der Spezies, es besteht jedoch auch eine deutliche individuelle Variation innerhalb einer Art. Beim Haushuhn beträgt die fertile Periode nach natürlicher Befruchtung ungefähr zwei Wochen (Wishart & Staines 1999), bei instrumenteller Samenübertragung variiert sie in Abhängigkeit von der Besamungsdosis und -frequenz in Relation zur Eiablage (Lepore & Marks 1966, Long 2006, McIntyre & Christensen 1985). Beim Strauß beträgt die Länge der fertilen Periode nahezu vier Wochen (Malecki et al. 2004). In einer Untersuchung über Aufbau, Anzahl und Größe der Samenspeicherdrüsen bei elf verschiedenen Spezies haben Birkhead und Moeller (1990) die kürzeste fertile Periode mit etwas über sechs Tagen bei der japanischen Wachtel nachgewiesen, die längste fertile Periode mit 42 Tagen wies das Truthuhn auf. Neben der Speicherung der Spermien kommt den Samenspeicherdrüsen eine Selektionsfunktion zu. Für die Befruchtung wandern die Spermien nach der Passage des Eies in das Infundibulum (Olsen & Neher 1948). Das ist der erste Abschnitt des Ovidukts, in den die Eizelle bestehend aus Dotterkugel und Keimscheibe nach der Ovulation gelangt. Zu diesem Zeitpunkt ist die innere Perivitellinmembran (IPVM) die äußerste umgebende Hülle (Okamura & Nishiyama 1978). Diese entspricht der Zona pellucida der Säuger-Eizelle (Howarth 1992). Erst während der Passage durch das Infundibulum wird der äußere Anteil der Perivitellinmembran gebildet. Zu diesem Zeitpunkt ist die Befruchtung bereits erfolgt, sofern befruchtungsfähige Spermien vorhanden waren. Im Gegensatz zu den Säugetieren, bei denen in der Regel lediglich ein Spermium die Zona pellucida durchdringt (Florman & Ducibel-

la 2006), liegt beim Vogel physiologische Polyspermie vor (Nickel et al. 2004, Birkhead et al. 1994). Es durchdringen viele Spermien die IPVM, doch nur eins verschmilzt mit der Eizelle (Perry 1986), die sich in der Region der Keimscheibe befindet. Kommt es zum Kontakt zwischen Perivitellinmembran und Spermium, findet die Akrosomenreaktion statt (Okamura & Nishiyama 1978). Das Eindringen der Spermien erfolgt durch Hydrolyse eines Kanals durch das Enzym Akrosin (Okamura & Nishiyama 1978). Die Fähigkeit der Spermien, durch Hydrolyse die Perivitellinmembran zu durchdringen ist ein zentrales Element im Rahmen der Befruchtung (Barbato et al. 1998). Im Bereich der Keimscheibe ist eine höhere Dichte an Hydrolyse-Löchern nachweisbar, als in den anderen Bereichen der IPVM (Bramwell & Howarth 1992). Durch welchen Mechanismus die erhöhte Attraktivität dieser Region für die Spermien verursacht wird, ist ungeklärt (Steele et al. 1994), zumal die Glycoproteine, die als Rezeptoren für auftreffende Spermien wirken, bei der Wachtel gleichmäßig über die IPVM verteilt sind (Rodler et al. 2012). Für Huhn und Pute beträgt die Befruchtungswahrscheinlichkeit 50 Prozent, wenn drei Spermien die IPVM im Bereich der Keimscheibe durchdringen (Wishart 1997). Die während der Passage des Eis durch den Legedarm gebildete mittlere Dottermembran (*Lamina continua*) und die äußere Perivitellinmembran verhindern das Eindringen weiterer Spermien (Bakst & Howarth 1977). Noch um die Eizelle vorhandene Spermien werden in der äußeren Perivitellinmembran (OPVL) eingeschlossen. Diese weisen sowohl beim Huhn (Wishart 1987), als auch bei der Pute (Wishart 1997) eine gleichmäßige Verteilung über die Oberfläche der Eizelle auf.

2.2 Spermienfunktionstests beim Vogel

2.2.1 Perivitellinmembran-Penetrationstest

Die Fähigkeit der Spermatozoen, an die innere Perivitellinmembran (IPVM) zu binden und diese zu durchdringen, ist von zentraler Bedeutung für die Befruchtung der Eizelle (Bakst & Howarth 1977). In vitro Perivitellinmembran-Bindungstests sind in der Literatur beschrieben (Robertson et al. 1997) und im Rahmen experimenteller Forschung wurde für einzelne Arten auch die Interspezies-Interaktion zwischen Membran und Spermien untersucht (Bramwell & Howarth 1992, Barbato et al. 1998, Win et al. 2005). In Untersuchungen mit Hahnenejakulaten wurden folgende prozentuale Interaktionsgrade detektiert: 100 Prozent mit der IPVM von Galliformes, 44 Prozent

mit der IPVM von Anseriformes und unter 30 Prozent mit der IPVM von Passeriformes und Columbiformes (Stewart et al. 2004). In dem zitierten Versuchsaufbau wurde die Perivitellinmembran der verschiedenen Ordnungen mit Spermaproben von Hähnen inkubiert. Als Kontrollgruppe wurde aus Hühnereiern isolierte IPVM mit Hahnersperma verwendet. Die Anzahl der durch eindringende Spermien entstandenen Löcher wurde untereinander verglichen und so die oben erwähnten Übereinstimmungen berechnet.

Der Perivitellinmembran-Penetrations-Test (in der Primärliteratur als sperm-egg-interaction-assay bezeichnet) wird verwendet, um die Penetrationsfähigkeit der Spermien einer Samenprobe nachzuweisen. Die Bindung der Spermien, Induktion der Akrosomenreaktion, Hydrolyse und Penetration der IPVM kann in vitro reproduziert werden. Robertson et al. (1997) haben nachgewiesen, dass die aus gelegten Eiern isolierte IPVM als Testmedium für den Perivitellinmembran-Penetrationstest verwendet werden kann. Um einen direkten Vergleich zwischen der IPVM aus gelegten Eiern, ovulierten Follikeln und vor der Ovulation gewonnenen Follikeln einer Henne zu ermöglichen, wurden Proben der IPVM in den drei genannten Stadien des Legeprozesses gewonnen und mit Spermien des gleichen Ejakulats inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der durch Hydrolyse verursachten Löcher besteht (Robertson et al. 1997). Die Funktionalität der Perivitellinmembran wird demnach durch die Bildung der übrigen Eibestandteile und die Eiablage nicht beeinträchtigt.

Für den Perivitellinmembran-Penetrationstest erfolgte die Separation der IPVM durch Säureinkubation nach der Methode von Kido und Doi (1988). Im Anschluss daran wurden ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke der IPVM mit einer Spermaprobe inkubiert. Das Auftreten von Hydrolyse-Löchern in der IPVM wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die Dichte der Löcher variierte je nach Konzentration der Spermaprobe. Die Löcher waren bereits nach zweieinhalb Minuten Inkubationszeit sichtbar und eine Verlängerung der Inkubationszeit führte nicht zu einer Steigerung der Anzahl, sondern nur zu einer Größenzunahme der Löcher durch fortschreitende Einwirkung der Enzyme (Robertson et al. 1997). Um die Aussagekraft des Tests zu überprüfen, wurden in einer zweiten Untersuchung die Spermien einer Lagerung unter verschiedenen Bedingungen unterzogen und die Reduktion der Penetrationsfähigkeit ermittelt. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Eosin-Permeabilität und Tetrazolium-

Reduktion als weiterer Funktionsparameter. Die Penetrationsfähigkeit war deutlich stärker reduziert, als die beiden anderen untersuchten Parameter. Der Perivitellin-membran-Penetrationstest ist demnach sensibler bezogen auf die für eine erfolgreiche Befruchtung erforderlichen Eigenschaften und erlaubt eine bessere Einschätzung der Qualität einer Spermaprobe. Weitere Vorteile sind die relativ einfache und kostengünstige Durchführbarkeit, sowie der geringe apparative Aufwand. Bongalhardo et al. (2009) ist es gelungen, eine Methode zur Kryokonservierung der IPVM zu entwickeln. Nach Separation der IPVM mittels Säureinkubation wurde die separierte Membran in 0,75 x 0,75 cm große Stücke geschnitten, und nach mehreren Waschschritten in einem Straw in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Membran befand sich in mDPBS (modified Dulbecco's phosphate-buffered saline) mit 0,4% bovinem Serum-Albumin und einem Zusatz von DMSO. Im Anschluss an den Auftau-Prozess wurde die Interaktion mit Spermien gemessen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Interaktionsfähigkeit der IPVM mit den Spermien durch die Kryokonservierung nicht beeinträchtigt wird (Bongalhardo et al. 2009). Diese Tatsache eröffnet neue Möglichkeiten hinsichtlich der Nutzung des sperm-egg-interaction-assays in der Routinediagnostik, da hiermit die zeitaufwändige Inkubation und Separation auf Vorrat durchgeführt werden können.

Andere Spezies, für die ebenfalls ein Perivitellin-Penetrationstest etabliert wurde, sind die Pute (Gill et al. 1999), die Ente (Kasai et al. 2000) und, in abgewandelter Form, das Emu (Malecki & Martin 2005).

2.2.2 Sperm Quality Index

Der Sperm Quality Index (SQI) ist ein Kriterium für die Qualität einer Spermaprobe. Er wird auf Basis der Merkmale Konzentration, Lebensfähigkeit und Motilität maschinell bestimmt (McDaniel et al. 1998). Die Bestimmung ist objektiv, preisgünstig und nimmt nur wenig Zeit in Anspruch. Gemessen werden Häufigkeit und Amplitude der Ablenkung eines Lichtstrahls durch sich bewegende Spermien bei der Durchleuchtung einer Probe. Da der Test in der Humanmedizin entwickelt wurde muss berücksichtigt werden, dass die Spermienkonzentration im Hahnenejakulat deutlich über der des Menschen liegt, weshalb eine Verdünnung vor der Bestimmung des SQI notwendig ist. Andernfalls wird die Beweglichkeit der Spermien im Probengefäß aufgrund der hohen Konzentration vermindert und die Werte sind falsch zu niedrig. Bei einer Verdünnung des Hahnenejakulats auf eine Konzentration von ca. 1×10^{12} Sper-

mien/ml mit minimal essential medium (MEM) (Howarth 1981) wurden die höchsten SQI-Werte für Hahnenejakulate ermittelt (McDaniel et al. 1998). Der SQI kann Werte zwischen 0 und etwa 600 annehmen. Er besitzt keine Einheit. Da alle drei in die Berechnung einfließenden Parameter in direktem Zusammenhang mit der Befruchtungsfähigkeit eines Spermiums stehen, besteht eine gute Korrelation zwischen SQI und Fruchtbarkeit ($r=0,73$) (Parker et al. 2000). Außer für die Evaluation von Hühner-ejakulaten ist der SQI auch zur Beurteilung von Putenejakulaten genutzt worden (Neuman et al. 2002).

2.2.3 Sperm-Mobility-Assay

Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien wird als elementarer Faktor für die Befruchtungsfähigkeit angesehen (Froman et al. 1999). Im sperm-mobility-assay wird die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien einer Probe untersucht. Die von Froman und Mc Lean (1996) entwickelte Methode basiert auf der Penetration von 2% Accudenz® (visköses Zentrifugations-Medium). Die Lösung wird bei 41°C (Körpertemperatur des Geflügels) präinkubiert, es erfolgt eine Leermessung im Photometer bei 55nm. Anschließend wird Accudenz® mit der Spermisuspension überschichtet. Während der Inkubationszeit dringen die beweglichen Spermien in das Medium ein. In einer zweiten photometrischen Messung wird die Steigerung der Absorption durch die eingedrungenen Spermien gemessen. Es kann jedoch auch die Transmission (in %) angegeben werden. Daraus lässt sich der Sperm Mobility Index (SMI) wie folgt berechnen: $SMI = 100 - \text{Transmission in Prozent}$. Der SMI ist ein zeitstabiler Funktionsparameter. Froman et al. (1998) untersuchten den SMI bei 49 Hähnen über einen Zeitraum von 34 Wochen. Der SMI war über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil.

Hähne können anhand der ermittelten Extinktions- bzw. SMI-Werte in Gruppen eingeteilt werden. Froman et al. (1997) haben herausgefunden, dass die Selektion der Zuchthähne auf Basis des in vitro sperm-mobility-assays erhöhte Fruchtbarkeit zur Folge hat. Sie klassifizierten die Hähne anhand der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in Accudenz® und besamten jeweils 55 Hennen pro Gruppe einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 14 Wochen. Die Besamung erfolgte mit einer gepoolten Spermisuspension mit 50×10^6 Spermien/100µl. Die Schlupfrate der Hennen, die mit dem überdurchschnittliche Beweglichkeit aufweisenden Sperma besamt worden waren, lag um 10% höher als in der Vergleichsgruppe.

Weist eine Spermaprobe einen sehr hohen Prozentsatz toter oder unbeweglicher Spermien auf, können falsch zu gute SMI-Werte gemessen werden. Dumpala et al. (2006) untersuchten den Einfluss der Konzentration lebensfähiger Spermien auf den SMI. An ihren Ergebnissen wird deutlich, dass der SMI nur dann aussagekräftig hinsichtlich der Motilität der Probe ist, wenn diese mehr als 60 Prozent lebensfähige Spermien enthält.

2.2.4 Hypo-osmotischer Schwelltest

Der hypo-osmotische Schwelltest (HOS-Test) wird angewendet, um die Integrität und funktionelle Aktivität der Spermienmembran zu überprüfen. Diese spielt eine entscheidende Rolle für den Metabolismus, die Fortbewegung, die Akrosomenreaktion und die Verschmelzung der Gameten (Jeyendran et al. 1984). Demzufolge hängt die Fruchtbarkeit auch entscheidend von einer intakten Spermienmembran ab. Entwickelt wurde der HOS-Test für die Anwendung in der Humanmedizin von Jeyendran et al. (1964) und ist seitdem bei vielen Säugetierspezies und Vögeln angewendet worden (Barrat et al. 1989, Correa & Zavos 1994, Kurni-Diaka 1993, Lechinak et al. 2002, Neild et al. 1999).

Die Spermien werden in eine hypo-osmotische Lösung gebracht. In der Literatur sind verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Osmolalitäten verwendet worden (Tab. 2.2.4.1). Ist die Membran funktionell intakt, kommt es zum Wassereinstrom in das Spermium, um den Konzentrationsgradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum auszugleichen. Es kommt zum Auftreten spiralig aufgerollter Spermischwänze und zur Schwellung durch den Wassereinstrom. Die Schwellung der Spermien ist vor allem in der Schwanzregion ausgeprägt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C (experimentelle Variationen sind in der Literatur beschrieben) wird die Probe mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie beurteilt. Es wird der Anteil der Spermien mit durch das hypoosmotische Medium bedingten Anomalien des Schwanzes prozentual erfasst. Um die Genauigkeit des Tests zu erhöhen, wird in manchen Untersuchungen vor der Inkubation ein Ausstrich ausgewertet, um die Anzahl an Spermien zu ermitteln, die bereits vor Beginn des Tests Anomalien des Schwanzes aufweisen (Bhattacharya 2010).

In humanmedizinischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Fertilitätsstörungen und Ergebnissen des HOS-Tests untersucht. Check et al. (1995) sehen den

HOS Test als besonders aussagekräftig an, da er Hinweise auf eine Subfertilität gibt, selbst wenn alle anderen standardmäßig erhobenen Ejakulatparameter sich in der Norm befinden. Die damit erwiesene Dysfunktion der Spermienmembran resultiert weniger in Befruchtungsdefiziten, als vielmehr in Implantationsstörungen (Check et al. 2001). In Untersuchungen an verschiedenen Vogelspezies ist der HOS-Test angewendet worden. Blanco et al. (2000) wiesen nach, dass deutliche spezies-spezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber hypotonischem Stress bestehen. Adler zeigten eine stärkere Toleranz als Huhn und Pute, am empfindlichsten waren die Spermien des Wanderfalken. Santiago-Moreno et al. (2009) nutzen unter anderem den HOS-Test, um circanuale Veränderungen der Spermaqualität bei spanischem Freilandgeflügel zu untersuchen.

Tabelle 2.2.4.1: Auswahl in der Literatur verwendeter hypotonischer Lösungen für den HOS-Test an Vogelspermien

Autor	Osmolalität	Chemische Zusammensetzung
Blanco et al. (2000)	50 mOsmol/kg	Natriumchlorid-Lösung
Malecki (2005)	34 mOsmol/kg	Dulbecco's Modified Essential Eagles medium
Santiago-Moreno et al. (2009)	100 mOsmol/kg	Natriumcitrat-Lösung

2.2.5 Tetrazolium-Reduktionstest

Mit diesem Test kann die metabolische Aktivität der Spermien einer Probe mittels Farbreaktion gemessen werden. Die Reduktion eines Indikatorfarbstoffs wird zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs herangezogen. Als Indikatorfarbstoffe werden quartäre Ammoniumverbindungen verwendet, die im oxidierten Zustand (Tetrazolium) farblos, im reduzierten Zustand (Formazan) rot sind. Entwickelt wurde dieser Test von Chaudhuri und Wishart (1988) mit dem Farbstoff INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid). Dieser wird durch zelleigene Oxido-Reduktasen zu Formazan reduziert. Die enzymatische Aktivität von Oxido-Reduktasen wird als entscheidendes Kriterium für den intakten Zellmetabolismus angesehen. Die Intensität der Farbstoffbildung korreliert mit dem Sauerstoffverbrauch der Spermien. Werden Proben mit standardisierter Dichte verglichen, kann über pho-

tometrische Messung die Extinktion ermittelt und im Rückschluss auf die metabolische Aktivität geschlossen werden. Da in diesem Test sowohl flüchtige als auch toxische Reagentien verwendet werden, wurde ein alternativer Ansatz mit dem Farbstoff MTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid) entwickelt (Hazary et al. 2001), um die praktische Anwendbarkeit zu verbessern. Ein weiterer Vorteil dieses Tests ist darin zu sehen, dass der bisher notwendige Zentrifugationsschritt entfällt, sodass die Umsetzung außerhalb eines Labors deutlich erleichtert wird.

Um zu überprüfen, wie aussagekräftig der MTT-Reduktions-Test im Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit einer Spermaprobe ist, führten Hazary et al. (2001) folgende Untersuchung durch: Die Korrelation zwischen MTT-Reduktion, ATP-Gehalt (Wishart 1982), Spermien-IPVM-Interaktion (Robertson et al. 1998), Spermien-Motilität (Froman & McLean 1996) und Befruchtungsfähigkeit wurde in einer Untersuchung mit Hahnenejakulaten experimentell ermittelt. Die Ergebnisse bewiesen eine hohe Korrelation zwischen MTT-Reduktion und jedem anderen untersuchten Parameter. Dieser Untersuchung zufolge ist der MTT-Reduktionstest gut geeignet, die Befruchtungsfähigkeit einer Spermaprobe zu überprüfen.

3 Material und Methoden

Alle Versuche wurden zwischen April 2011 und August 2013 in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.1 Versuch 1: Präparationsmodifikation

In diesem Versuch wurde die Säure-Inkubationsmethode nach Kido & Doi (1988) angewendet, um die IPVM zu separieren. Nach der Trennung der inneren von der äußeren Perivitellinmembran durch Inkubation in 0,01 molarer HCl wurde unter dem Stereomikroskop (M8, Wild Heerburg) die innere von der äußeren Perivitellinmembran gelöst. Ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes Stück wurde in einem Tropfen 1% Kochsalzlösung auf einen Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden mit 10- bis 20-facher Vergrößerung im Dunkelfeldmikroskop (Leica DMR HC, Leica Microsystems Wetzlar) ausgewertet. Das Vorhandensein von Hydrolyse-Löchern, die durch eindringende Spermien verursacht wurden, galt als Beweis dafür, dass die Imprägnation (Eindringen eines Spermiums in die Eizelle) stattgefunden hat.

Befruchtete Eier wurden nach den im Folgenden beschriebenen Protokollen präpariert. Untersucht wurden der Einfluss von Säurekonzentration und Inkubationszeit auf den Separationserfolg. Als Erfolgskriterien galten einerseits die Separierbarkeit des inneren und äußeren Anteils der Perivitellinmembran unter dem Stereomikroskop und andererseits der Nachweis von Löchern in der IPVM mittels Dunkelfeldmikroskopie.

Es wurden nach den Protokollen II bis IV jeweils 10 Eier behandelt und als Kontrollgruppe 10 Eier nach dem Standardprotokoll I. Die Membranen wurden teilweise am Tag der Inkubation ausgewertet, teilweise wurden sie über Nacht bei 4°C in 1% NaCl-Lösung aufbewahrt (Details siehe Tabellen im Anhang).

3.1.1 Eier

Die für die Versuche verwendeten Eier wurden aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibie und Fische der Justus-Liebig-Universität bezogen. Es handelte sich je nach Fragestellung um potentiell befruchtete, oder unbefruchtete Eier von Hühnern, Enten,

Fasanen, Falken, Wachteln und Nymphensittichen. Die Enteneier stammten aus der Hobbyhaltung Dr. A. Wehrend in Dornholzhausen.

3.1.2 Präparation der Perivitellinmembran

3.1.2.1 Protokoll I

Die Eierschale wurde geöffnet, die Dotterkugel vorsichtig entnommen, um die Perivitellinmembran nicht zu beschädigen. Um anhaftende Eiweißreste möglichst vollständig zu entfernen, wurde die Dotterkugel drei bis vier Mal mit 1% NaCl-Lösung gewaschen (Abb. 3.1.2.1.1).



Abbildung 3.1.2.1.1: Waschen der Dotterkugel mit 1% NaCl nach Entnahme aus der Eierschale

Kam es bei der Entnahme aus der Schale oder dem Waschen zu einer Beschädigung der Perivitellinmembran und zum Austritt von Dotter, wurde das Ei verworfen. In den Vorversuchen wurde herausgefunden, dass während der Säureinkubation austretender Dotter dazu führte, dass die Separation der beiden Anteile der IPVM nicht möglich war.

Anschließend wurde die Dotterkugel in einer Glasküvette mit 0,01molarer HCl (pH = 1,99) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert (Abb. 3.1.2.1.2). Nach der Inkubation wurde die sie aus der Säure entnommen, erneut mit 1% NaCl-Lösung gewaschen und die Perivitellinmembran mithilfe eines Skalpells eröffnet.

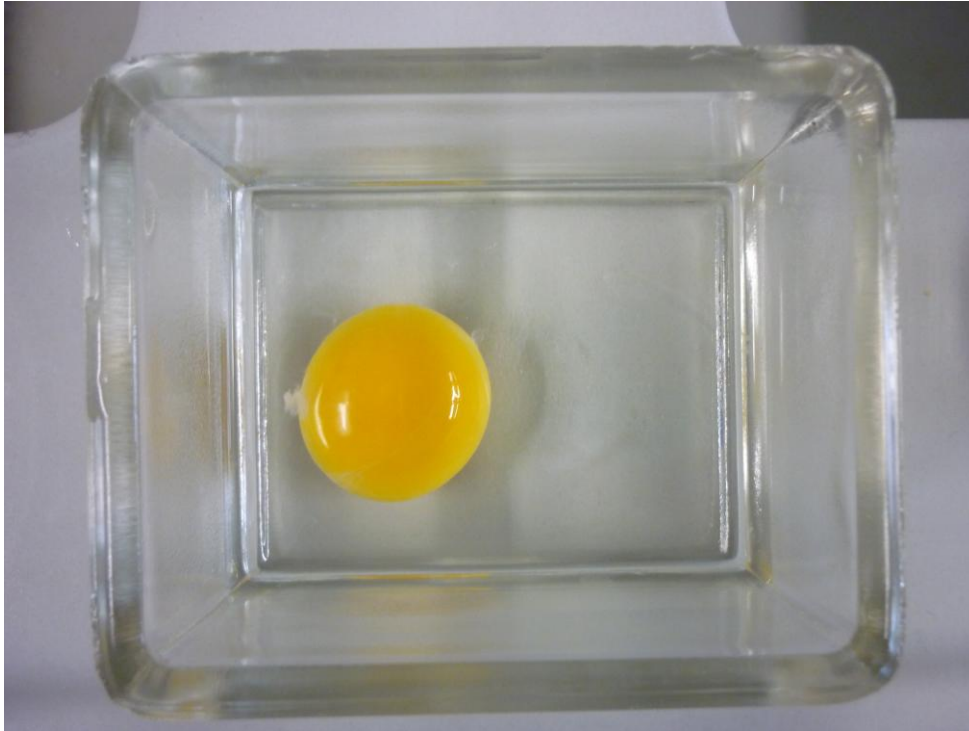


Abbildung 3.1.2.1.2: Inkubation der Dotterkugel in 0,01mol HCl

Die Membran wurde aus der Dotterflüssigkeit entnommen, mehrmals in 1% NaCl gewaschen, um anhaftende Eigelbrückstände zu entfernen und in eine Glaspetrischale mit 1% NaCl überführt. Unter dem Stereomikroskop (M8, Wild Heerburg) wurden der innere und der äußere Anteil der Perivitellinmembran mit Pinzetten voneinander getrennt (Abb. 3.1.2.1.3).

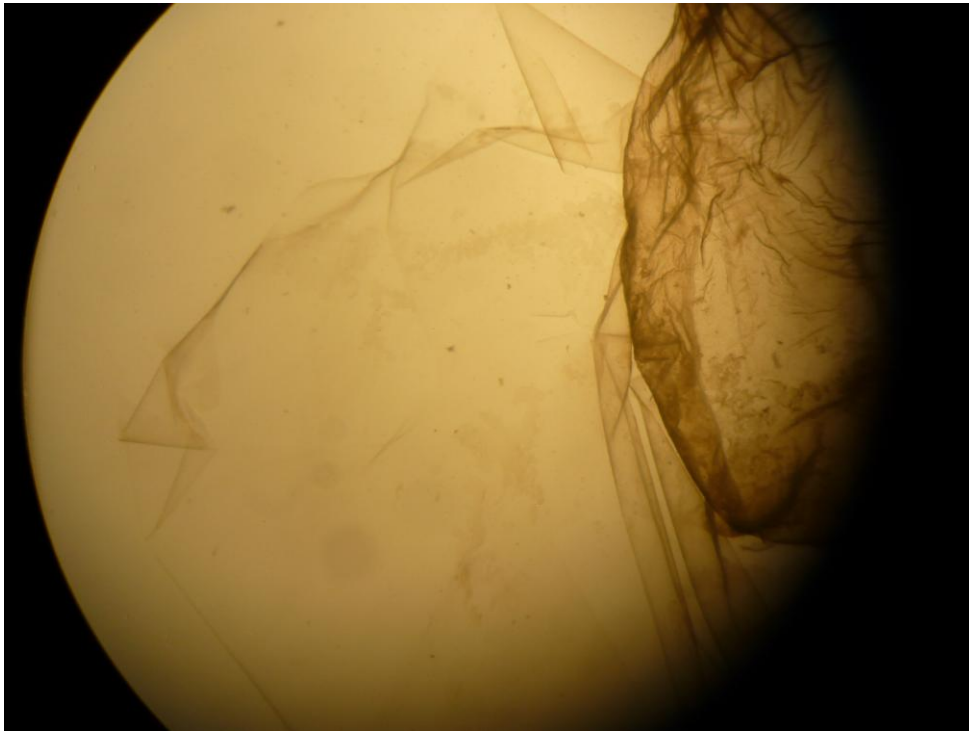


Abbildung 3.1.2.1.3: Separation der inneren von der äußeren Perivitellinmembran unter dem Stereomikroskop

Es wurden ca. 0,5x0,5 cm große Stücke der IPVM mit einer Schere abgeschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Zum Teil wurden die Präparate gefärbt und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte mittels Dunkelfeldmikroskopie.

3.1.2.2 Protokoll II

Die Vorbereitung der Eier erfolgte entsprechend der Vorgehensweise in Protokoll I. Die Inkubationszeit wurde auf 30 Minuten verkürzt.

3.1.2.3 Protokoll III

Die Vorbereitung der Eier erfolgte entsprechend der Vorgehensweise in Protokoll I. Die Konzentration der Salzsäure wurde auf 0,1 mol/l (pH = 1,38) erhöht.

3.1.2.4 Protokoll IV

Die Vorbereitung der Eier erfolgte entsprechend der Vorgehensweise in Protokoll I. Die Säurekonzentration wurde auf 0,1 mol/l erhöht und die Inkubationszeit auf 30 Minuten verkürzt.

3.1.3 Färbung

Ein Teil der Präparate wurde mit 1:1 mit 1% NaCl-Lösung verdünnter Hämatoxilin-Lösung (Merck KGaA/Darmstadt) gefärbt. Die Färbelösung wurde verdünnt in einer Spritze aufgezogen und jeweils einige Tropfen auf den Objektträger aufgetropft. Durch leichtes Schwenken vermischte sich die Färbelösung mit der Flüssigkeit auf dem Objektträger und verteilte sich gleichmäßig. Es wurden nicht alle hergestellten Präparate gefärbt, da bei der Auswertung im Dunkelfeld auch ohne eine Färbung ein ausreichender Kontrast hergestellt werden konnte.

3.1.4 Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter einem Lichtmikroskop DM R der Firma Leica (Leica Microsystems GmbH/Wetzlar). Um die in der IPVM vorhandenen Löcher sichtbar zu machen, wurde im Dunkelfeld mikroskopiert. Zur Dokumentation wurden einzelne Präparate mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Leica DC 300-Kamera unter hundertfacher Vergrößerung fotografiert.

3.2 Versuch 2: Haltbarkeitsstudie

In diesem Versuch wurden befruchtete Hühnereier unter verschiedenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt, um den Einfluss der Lagerung auf die Separationseigenschaften der Perivitellinmembran bei Anwendung der Säureinkubationsmethode zu überprüfen.

Die untersuchten Parameter waren Lagerungsdauer, Umgebungstemperatur und Lichteinfluss. Die Lagerung erfolgte bei Licht und Raumtemperatur, bei Dunkelheit und Raumtemperatur sowie bei Dunkelheit und Kühlschranktemperatur. Es wurden pro Gruppe 10 Eier untersucht. Die Präparation aller Eier erfolgte nach Protokoll I.

Gruppe A:

Die Eier wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur und Raumbeleuchtung gelagert. Zu Beginn der Untersuchung waren die Eier ca. 10 Tage alt und bisher bei 15 - 18° C im Dunkeln gelagert worden. An jedem Untersuchungstag wurden zwei Eier präpariert. Jeweils ein Ei wurde am gleichen Tag ausgewertet, die Membran des Zweiten wurde nach der Separation in 1% NaCl-Lösung bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte zwei bis drei Tage später. Die Separation wurde als erfolgreich angesehen, wenn die Trennung der inneren von der äußeren Perivitell-

linmembran möglich war. Da bereits nach drei Tagen Lagerungsdauer keine Separation mehr erzielt werden konnte, wurde die Inkubationszeit ab Tag neun um 30 Minuten verlängert, da während der Säureinkubationszeit die Separation der Membranen erfolgt. Es wurde überprüft, ob dadurch der Separationserfolg gesteigert werden kann.

Gruppe B:

Die Lagerung der Eier erfolgte bei Kühlschranktemperatur und Dunkelheit. Die Eier waren zu Beginn der Untersuchung ca. 18 Tage alt und bei 4°C im Dunkeln gelagert worden. Es wurden pro Untersuchungstag zwei Eier präpariert und die Separationseigenschaften überprüft. Der Untersuchungszeitraum betrug 13 Tage. Die Auswertung erfolgte analog zu Gruppe A.

Gruppe C:

Die Hühnereier wurden bei Raumtemperatur und Dunkelheit gelagert. Die Eier waren zu Beginn der Untersuchung ca. 14 Tage alt. Sie wurden über einen Zeitraum von 16 Tagen untersucht. Die Auswertung erfolgte analog zu Gruppe A.

3.3 Versuch 3: Bebrütungsversuch

In diesem Versuch wurde die Anwendbarkeit der Säureinkubationsmethode bei bebrüteten Hühnereiern untersucht. Diese Tatsache ist von Bedeutung, um bei Eiern, die eigentlich befruchtet sein sollten, beim Schieren jedoch als unbefruchtet detektiert werden, Rückschlüsse auf die Imprägnation ziehen zu können. Der Versuchsaufbau umfasste jeweils eine Gruppe mit befruchteten und eine zweite Gruppe mit unbefruchteten Hühnereiern. Zusätzlich wurden alle beim Schieren als unbefruchtet detektierten Eier untersucht.

Befruchtete Hühnereier wurden bei 37,5°C und 55% Luftfeuchtigkeit bebrütet (Schumacher Brutmaschine VFG-1, Bj. 1973). Beginnend am Tag vor Bebrütungsbeginn wurde täglich untersucht, ob eine Separation der IPVM mittels der Säureinkubationsmethode möglich ist. Der Untersuchungszeitraum betrug sieben Tage. Eine Weiterführung der Untersuchung nach Tag sieben erwies sich als nicht sinnvoll, da bereits ab Tag fünf nach Bebrütungsbeginn die Entwicklung des Embryonen so weit fortgeschritten war, dass eine Vereinzelung der Dotterkugel ohne massive Beschädigung der Perivitellinmembran nicht mehr möglich war.

In einer zweiten Gruppe wurden unbefruchtete Hühnereier unter gleichen Bedingungen bei 37,5°C und 55% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Analog zu den befruchteten Eiern wurden die Separationseigenschaften vor Beginn der Bebrütung und bis zum siebten Tag der Bebrütung überprüft.

Aus der Gruppe der potentiell befruchteten Eier wurden außerdem diejenigen untersucht, die beim Schieren an Tag sechs nach Beginn der Bebrütung als nicht befruchtet detektiert worden waren.

Alle untersuchten Eier wurden am Tag der Untersuchung aus dem Wärmeschränk entnommen und die Separation der Perivitellinmembran mittels Säureinkubation induziert. Die Inkubation erfolgte in 0,01 molarer HCl für 60 Minuten.

3.4 Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Vogelspezies

In diesem Versuch wurde die Säureinkubationsmethode an befruchteten oder unbefruchteten Eiern anderer Vogelspezies überprüft. Von jeder Spezies wurden zehn Eier untersucht: Turmfalke (*Falco tinnunculus*), Fasan (*Phasianus colchicus*), Laufente, Wachtel (*Coturnix coturnix*), Hausgans und Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*). Die Präparation erfolgte in der Regel nach Protokoll I / Versuch 3.1 (Abweichungen sind entsprechend vermerkt). Die Aufbewahrung aller Eier erfolgte im Kühlschrank, sofern sie nicht umgehend untersucht wurden.

Die Eier aller untersuchten Spezies stammten von privaten Tierhaltern. Der Befruchtungszustand war nur teilweise bekannt. Die Eier waren, bis auf die Falkeneier, vor Beginn der Untersuchung nicht bebrütet worden. In der Untersuchung der Spezies Falke wurden bereits bebrütete Eier verwendet, in denen beim Schieren an Tag 7 - 10 nach Bebrütungsbeginn kein Embryo nachgewiesen werden konnte.

3.5 Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest

In diesem Versuch wurde der Perivitellin-Penetrationstest modifiziert, um die Penetrationsfähigkeit von Spermien verschiedener Spezies in vitro testen zu können. Als Modell wurde die IPVM von unbefruchteten Hühnereiern verwendet. Die Separation erfolgte mittels Säurehydrolyse mit 0,01 molarer HCl und 60 Minuten Inkubationszeit.

Die separierte IPVM wurde in 1% NaCl-Lösung bei 4 - 6°C für höchstens vier Tage aufbewahrt. Es wurden jeweils ca. 0,5 x 0,5 cm große Teile der IPVM in 1000 µl Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) gepuffert mit 1 mol HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) überführt. Danach wurde eine definierte Anzahl an Spermien zu der Membran hinzugegeben. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 41°C im Wasserbad für 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben aus dem Wasserbad entnommen. Die Membranteile wurden auf einen Objektträger in einem Tropfen 1% NaCl-Lösung aufgebracht. Die Auswertung erfolgte mittels Dunkelfeldmikroskopie. Es wurde in jedem Präparat die Anzahl der durch Hydrolyse entstandenen Löcher in der IPVM nummerisch ermittelt. Pro Präparat wurden bei 100-facher Vergrößerung zehn per Zufall ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt. Vor der Auszählung erfolgte eine Durchmusterung des Gesamtpräparates, um Lokalisationen mit einer stark erhöhten oder erniedrigten Dichte an Hydrolyse-Löchern zu bestimmen. Die Auswahl der zur Auswertung gewählten Gesichtsfelder erfolgte in einem Bereich mittlerer Lochdichte. Wenn die Anzahl der Löcher so groß war, dass sich in einem der Gesichtsfelder über 300 Löcher befanden, wurde die Anzahl mit > 300 angegeben und – aufgrund mangelnder Übersichtlichkeit – die Löcher nicht einzeln ausgezählt.

Nicht alle Membranteile der IPVM waren nach der Inkubation mit Ejakulat auswertbar. In Einzelfällen war es nur unzureichend oder gar nicht möglich, die Membran nach Entnahme aus dem Inkubationsmedium auf dem Objektträger auszubreiten. In diesem Fall war die Auswertung nicht möglich, dies ist in den Ergebnisprotokollen entsprechend angegeben.

3.5.1 Nativsperma Hahn

Es wurde natives Ejakulat von Hähnen (*Gallus gallus forma domesticus*) verwendet. Für die Absamung wurden die Tiere von einer Hilfsperson fixiert, die Kloake dargestellt und mittels abdominaler Massage die Samenleiter manuell entleert. Das Ejakulat wurde in Glaskapillaren von der Kloake abgenommen. Es wurden gepoolte Proben von bis zu vier Tieren verwendet. Die Samenentnahme wurde in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen durch H. Schneider und D. Fischer durchgeführt.

Anschließend wurde eine Samenuntersuchung durchgeführt. Volumen und Farbe des Ejakulats wurden in der Mikrokapillare bewertet. Dichte und Vorwärtsbeweglichkeit wurden ermittelt, indem die Mikrokapillare auf einen Objektträger gelegt und mittels zehnfacher Vergrößerung unter einem Videomikroskop (Leica Microsystems DM750, Wetzlar) durchmustert wurde. Eine vorläufige Abschätzung der Spermamenge wurde vorgenommen, indem die Samendichte in der Kapillare von (+) bis ++++ abgestuft wurde (Neumann et al. 2013). Im Anschluss daran wurde das Ejakulat in ein Eppendorf safe-lock Tube (1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Der pH wurde gemessen, indem ein kleiner Tropfen des Ejakulates ($>0,5\mu\text{l}$) auf einen Indikatorstreifen (Spezialindikatorpapier, pH 5.5 - 9.0; 5.4 - 7.0 & 6.4 - 8.0, Macherey-Nagel GmbH & co. KG, Düren) aufgebracht wurde. Zur Berechnung der Konzentration wurde das Ejakulat hundertfach mit destilliertem Wasser verdünnt in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die Gesamtzahl wurde berechnet, indem Konzentration und Volumen miteinander multipliziert wurden (Stelzer et al. 2005). Für die Lebend-Tot-Färbung des Nativspermas wurden 2 μl Samen mit der gleichen Menge Eosin 2% angefärbt. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet und unter 40facher Vergrößerung ausgewertet. Spermien mit weißen Köpfen wurden als lebend, solche mit rot angefärbten Köpfen als tot angesehen. Zusätzlich wurde eine morphologische Beurteilung von 200 Spermien im Eosin-gefärbten Ausstrich durchgeführt. Morphologische Abweichungen wurden diagnostiziert, wenn ein Spermium Missbildungen im Bereich des Kopfes, des Akrosoms, des Mittelstücks oder des Schwanzes aufwies. Die verschiedenen Abweichungen wurden klassifiziert, wie von (Marvan et al. 1981) beschrieben. Das restliche Ejakulat wurde in einem Verhältnis von 1:2 mit einem kommerziell erhältlichen Samenverdünner (6-Hour SemAid, PHL Associates, Inc., Davis, CA, USA) verdünnt. Die Motilität wurde manuell ermittelt, indem 6 μl des verdünnten Samens auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen wurden. Es wurden fünf Gesichtsfelder ausgezählt und Beweglichkeit der Spermien beurteilt, wobei zwischen unbeweglichen, vorwärts-, orts- und kreisbeweglichen Spermien unterschieden wurde. Die Samenuntersuchung wurde in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen durch H. Schneider durchgeführt. Es wurden elf Ejakulate untersucht. Das zur Verfügung stehende Volumen wurde jeweils auf zehn Proben der IPVM aufgeteilt.

3.5.2 Tiefgefrier-Sperma Hahn

Es wurde kryokonserviertes Hahnenejakulat verwendet. Es handelte sich um gepoolte Proben von Hähnen, die im Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Löffler-Instituts in Mariensee gehalten wurden. Das Ejakulat wurde mittels Abdominalmassage gewonnen, bei Raumtemperatur mit HS-1 Medium verdünnt und bei 4°C zum Labor transportiert. Dort wurden die Ejakulate gepoolt und mit dem Gefrierverdünner (Mix 2 = 2 Teile N- Methylacetamid + 1 Teil Dimethylformamid) in einer Endkonzentration von 6,5% gemischt in Portionen zu je 300 Mio. Samenzellen pro Paillette eingefroren. Es wurde folgendes Einfrierprotokoll verwendet: Langsames Einfrieren mit -3°C/min bis -35°C, dann schnelles Einfrieren mit -50°C/min bis -130°C. Danach wurden die Pailletten in flüssigen Stickstoff (- 196°C) eingetaucht und so auch dauerhaft gelagert. Vor und nach dem Einfrieren erfolgte die Untersuchung des Spermapools: Motilität und Geschwindigkeit mittels CASA-System (Fa. Hamilton Thorne), sowie die Beurteilung der Morphologie.

Zum Auftauen wurden die Pailletten aus dem Container entnommen und unmittelbar in Eiswasser überführt. Dort wurden sie für 60 Sekunden aufgetaut. Danach wurden jeweils 2 µl Ejakulat zu der Membran in DMEM zugegeben. Die Inkubation erfolgte analog zum Nativejakulat Hahn. Es wurden Proben aus zehn verschiedenen Pailletten untersucht, pro Untersuchung wurden zehn Präparate angefertigt.

3.5.3 Nativ-Sperma Nymphensittich

Es wurde natives Nymphensittichejakulat verwendet. Bei jeder Untersuchung wurde aufgrund des sehr kleinen Ejakulatvolumens gepooltes Sperma von ungefähr zehn Hähnen gewonnen. Die Entnahme erfolgte mittels Abdominalmassage (Burrows & Quinn 1935, 1937, Schramm 2005). Unmittelbar nach der Entnahme wurde eine Samenuntersuchung durchgeführt. Volumen, Dichte, Beimengungen und Massenbewegung wurden analog zu den Untersuchungen des nativen Hahnenejakulates - (siehe 3.5.1) bestimmt. Samenentnahme und -untersuchung wurden durch H. Schneider durchgeführt.

Das Ejakulat wurde mit einem nach Schneider (unveröffentlichte Daten) für Nymphensittichejakulat hergestellten Verdünner in einer Konzentration von 1:1, 1:2 oder 1:3 verdünnt (Details s. Tabellen im Anhang). Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 41°C für 10 Minuten. Die Auswertung erfolgte, wie oben angegeben.

3.5.4 Nativ-Sperma Falke

Es wurde natives Ejakulat nachstehend aufgeführten Tieren verwendet: drei Wanderfalken (*Falco peregrinus*), einem Gerfalken (*Falco rusticolus*) und einem Hybridfalken (Gerfalke/Sakerfalke x Sakerfalke).

Die Entnahme erfolgte wie oben beschrieben mittels Abdominalmassage und wurde von H. Schneider und D. Fischer durchgeführt. Nach der Entnahme wurde eine Spermauntersuchung durchgeführt (H. Schneider). Dichte, Massenbewegung, Volumen und Beimengungen wurden bestimmt, wie unter 3.5.1 angegeben. Die Proben wurden zum Teil nativ, oder mit kommerziell erhältlichem Verdünner (6-Hour SpermAid, PHL Associates, Inc., Davis, CA, USA) im Verhältnis 1:1 verdünnt verwendet. Die Inkubation erfolgte analog zu den anderen Proben im Wasserbad bei 41°C für 10 Minuten. Aufgrund des geringen Ejakulatvolumens wurden pro Untersuchung fünf Proben der aus Hühnereiern isolierten IPVM mit dem Falkensperma inkubiert und anschließend mittels Dunkelfeldmikroskopie ausgewertet.

3.6 Statistische Auswertung

Die Verwaltung der Daten und die Erstellung von Diagrammen und Tabellen erfolgte mit den Programmen Microsoft® Word 2007 (Microsoft Corporation) sowie Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation). Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 8.1 (1993) durchgeführt.

Um die Auswirkung der verschiedenen Salzsäurekonzentrationen und Inkubationszeiten auf den Separationserfolg zu überprüfen, wurde eine exakte, zweifaktorielle logistische Regression durchgeführt (Programm: LogXact) (Cytel Studio LogXact 2010).

In gleicher Weise wurde der Einfluss der Lagerungsparameter auf den Separationserfolg berechnet. Die Berechnung erfolgte mit und ohne Berücksichtigung der Wechselwirkung der Parameter.

Die Überprüfung der Auswirkung der Befruchtung auf den Separationserfolg erfolgte ebenfalls mittels zweifaktorieller logistischer Regression.

Ob die Unterschiede im Separationserfolg bei den verschiedenen Tierarten als statistisch signifikant anzusehen sind, wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet (Program StatXact) (Cytel Studio StatXact 2010).

Zur Auswertung des Perivitellinmembran-Penetrationstests kamen folgende Verfahren zum Einsatz: Um für die nativen Hahnenejakulate den Zusammenhang zwischen der Spermamenge und der Anzahl der Hydrolyse-Löcher festzustellen, wurde mit dem Programm BMDP6D eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die verwendeten Parameter waren die Spermamenge und der Median der Lochzahl bei allen durchgeführten Wiederholungen. Angegeben wurde der Zusammenhang mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s). Die Standardabweichung (s) und der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) der Lochzahl wurden in einem Korrelationsdiagramm gegenübergestellt. Der Zusammenhang wurde durch den Korrelationskoeffizienten (r) und die Regressionsgerade angegeben.

Für die Auswertung des Penetrationstests mit kryokonserviertem Hahnenejakulat wurde in gleicher Weise ein Korrelationsdiagramm erstellt.

Die Ergebnisse galten als statistisch signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ entsprach.

4 Ergebnisse

4.1 Versuch 1: Präparationsmodifikation

Der Separationserfolg in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Säurekonzentration ist in Tabelle 4.1.1 dargestellt. Die besten Ergebnisse wurden unter Verwendung des bereits in der Literatur beschriebenen Protokolls (Nr. I, HCl 0,01 Mol/l, Inkubationszeit 60 Min.) erzielt. Bei Erhöhung der Salzsäurekonzentration auf 0,1 Mol/l konnte weder nach 30- noch nach 60-minütiger Inkubationszeit die Separation der IPVM erzielt werden.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,582$). Zwischen den Salzsäurekonzentrationen besteht ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich des Separationserfolgs ($p < 0,0001$). Bei der Verwendung von 0,01 molarer HCl betrug die Erfolgsrate 90 bzw. 70 Prozent, bei der Verwendung von 0,1 molarer HCl konnte bei keinem der inkubierten Eier eine Separation durchgeführt werden (Erfolg = 0 Prozent).

Tabelle 4.1.1 Ergebnisse der Präparation nach verschiedenen Protokollen mit Variation der Säurekonzentration und Inkubationszeit bei unbebrüteten Hühnereiern

Proto- koll	Anzahl	Konzentrati- on HCl in mol/l	Inkubationszeit /Minuten	Separation erfolgreich n (%)	Separation erfolglos n (%)
I	10	0,01	60	9 (90)	1 (10)
II	10	0,01	30	7 (70)	3 (30)
III	10	0,1	60	0 (0)	10 (100)
IV	10	0,1	30	0 (0)	10 (100)

4.2 Versuch 2: Haltbarkeitsstudie

Die Ergebnisse der Haltbarkeitsstudie sind in Tabelle 4.2.1 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Einfluss auf den Separationserfolg konnte nur für die Lagerungsdauer nachgewiesen werden ($p = 0,0102$). Der Separationserfolg nahm mit fortschreitender

Lagerungsdauer ab. Der Einfluss von Licht und Umgebungstemperatur auf den Separationserfolg war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 4.2.1: Ergebnisse der Haltbarkeitsstudie: Auswirkung von Umgebungstemperatur, Lichteinwirkung und Lagerungsdauer auf den Separationserfolg bei Hühnereiern.

Gruppe	Lagerung	Anzahl	Separation erfolgreich n (%)	Separation erfolglos n (%)	Lagerungs- dauer / Tage
A	Licht und Raumtemperatur	10	2 (20)	8 (80)	3
B	Dunkelheit und Kühlschranktemperatur	10	6 (60)	4 (40)	14
C	Dunkelheit und Raumtemperatur	10	3 (30)	7 (70)	7

4.3 Versuch 3: Bebrütungsversuch

Im Bebrütungsversuch erzielte Ergebnisse sind in den Tabellen 4.3.1 bis 4.3.3 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Separation der IPVM durch Säureinkubation bei bebrüteten Eiern nicht initiiert werden kann, unabhängig davon, ob es sich um befruchtete, oder unbefruchtete Eier handelt. Aus der Gruppe der befruchteten Eier konnte am zweiten Tag der Bebrütung nur noch aus einem Ei die IPVM separiert werden. Ab dem vierten Tag der Bebrütung war die Entwicklung des Embryos bereits so weit fortgeschritten, dass die Dotterkugel nicht mehr aus dem Ei isoliert werden konnte, ohne beschädigt zu werden. Es kam zu einer festen Anhaftung der Dotterkugel an die Schalenhaut, sodass bei 50% der Eier schon bei der Eröffnung der Kalkschale der Dotter austrat. Am Tag fünf und sechs konnten die Dotterkugeln nicht mehr aus den Eiern entnommen werden. Bei den unbefruchteten Hühnereiern gelang nur am ersten Tag der Bebrütung noch die Separation der IPVM bei zwei von sechs untersuchten Eiern. An allen folgenden Untersuchungstagen konnte aus keinem der Eier die IPVM isoliert werden.

Die Separation der IPVM gelang bei keinem der Eier, die beim Schieren an Tag 6 nach Bebrütungsbeginn als „unbefruchtet“ befunden wurden.

Dementsprechend konnte für die Bebrütungsdauer ein signifikanter Einfluss auf den Separationserfolg nachgewiesen werden ($p < 0,0001$). Zwischen der Gruppe der befruchteten und der unbefruchteten Eier war der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,12106$).

Tabelle 4.3.1 Ergebnisse der Separation befruchteter Hühnereier nach Inkubation bei 37,7°C und 55% Luftfeuchtigkeit

Tag seit Bebrütungsbeginn	Anzahl	Separation erfolgreich n (%)	Separation erfolglos n (%)
0	6	6 (100)	0 (0)
1	6	5 (83,3)	1 (16,7)
2	6	1 (16,7)	5 (83,3)
3	6	0 (0)	6 (100)
4	6	0 (0)	6 (100) ¹
5	6	0 (0)	6 (100) ²
6	6	0 (0)	6 (100) ³
7	6	0 (0)	6 (100) ³

¹Dotterkugeln nur noch eingeschränkt aus dem Ei entnehmbar; bei zwei von sechs Eiern konnte nur die Membran inkubiert werden, da die Dotterkugel beim Entnahmeversuch zu stark beschädigt wurde.

² Keine Inkubation der Dotterkugeln möglich, Perivitellinmembran schon bei vorsichtiger Eröffnung der Schale mittels Skalpellklinge beschädigt, durch Haftung an der Schalenhaut. Membran zu fragil, um nur Anteile isolieren und inkubieren zu können.

³ Dotterkugel nicht aus dem Ei entnehmbar

Tabelle 4.3.2 Untersuchung der Eier, die beim Schieren an Tag 6 nach der Bebrütung als unbefruchtet detektiert waren

Anzahl	Separation erfolgreich n (%)	Separation erfolglos n (%)
3	0 (0)	3 (100)

Bei keinem der unbefruchteten Eier, die beim Schieren am sechsten Tag der Bebrütung als unbefruchtet detektiert worden waren, konnte eine Separation der IPVM induziert werden.

Tabelle 4.3.3: Ergebnisse der Separation unbefruchteter Hühnereier nach Inkubation bei 37,7°C und 55% Luftfeuchtigkeit

Tag seit Bebrütungsbeginn	Anzahl	Separation erfolgreich n (%)	Separation erfolglos n (%)
0	6	6 (100)	0 (0)
1	6	2 (33,3)	4 (66,7)
2	6	0 (0)	6 (100)
3	6	0 (0)	6 (100)
4	6	0 (0)	6 (100)
5	6	0 (0)	6 (100)
6	6	0 (0)	6 (100)
7	6	0 (0)	6 (100)

4.4 Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Vogelspezies

Die Anwendbarkeit der Säureinkubationsmethode für die Separation der IPVM wurde außer an Eiern des Huhns bei folgenden Spezies untersucht: Turmfalke (*Falco tinnunculus*), Fasan (*Phasianus colchicus*), Laufente, Wachtel (*Coturnix coturnix*), Hausgans und Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*) (Tabelle 4.4.1). Die Separation gelang nicht bei allen untersuchten Spezies. Keine Separation wurde mit den Eiern von Hausgans und Nymphensittich erzielt. Die Separation der Falkeneier war nur bei 20% der Proben erfolgreich, bei den übrigen untersuchten Spezies lag der Separationserfolg bei mindestens 40%.

Tabelle 4.4.1 Separationserfolg bei Eiern anderer Vogelspezies

Vogelspezies	Anzahl	Separation erfolgreich n (%)	Separation erfolglos n (%)
Turmfalke	10	2 (20)	8 (80)
Fasan	9	4 (44,4)	5 (55,6)
Laufente	10	5 (50)	5 (50)
Wachtel	10	4 (40)	6 (60)
Hausgans	10	0 (0)	10 (100)
Nymphensittich	10	0 (0)	10 (100)

Der zwischen den einzelnen Spezies nachgewiesene, unterschiedliche Separationserfolg ist statistisch signifikant ($p=0,0118$), wie mit dem exakten Test nach Fisher berechnet wurde.

4.5 Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest

4.5.1 Nativ-Sperma Hahn

Bei allen zehn untersuchten Ejakulaten kam es zur Penetration der Spermien durch die IPVM, sodass in den Membranteilen penetrationsbedingte Hydrolyse-Löcher unter dem Mikroskop sichtbar waren (Tabelle 4.5.1).

Tabelle 4.5.1: Ergebnisse des Perivitellinmembran-Penetrationstests mit nativem Hahnenejakulat

Ejakulat Nr.	Summe Löcher	Anzahl Präparate > 300 Löcher	Präparate nicht auswertbar
1	48	0	0
2	20	0	1
3	239	0	0
4	212	0	1
5	31	0	1
6	33	0	1
7	284	0	2
8	13	0	0
9	1.832	5	1
10	219	0	0
11	1.300	2	0

Zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen der Spermamenge und der Anzahl an Hydrolyse-Löchern wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen dem Median der Lochzahl in den untersuchten Präparaten und der Spermamenge wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt. Die nachgewiesene positive Korrelation war statistisch signifikant ($r_s = 0,720$, $p = 0,0125$).

Zur Darstellung der Abhängigkeit zwischen der Standardabweichung s und dem Mittelwert der Lochzahl \bar{x} wurde ein Korrelationsdiagramm erstellt. Die Ejakulate Nr. 9 und Nr. 11 wurden nicht in die Berechnung einbezogen, da der arithmetische Mittelwert verwendet wurde. Dieser kann für die Ejakulate mit einer Lochzahlangabe >300 nicht korrekt ermittelt werden, da bei der Berechnung des Quotienten aus der Summe eine genaue Zahl erforderlich ist.

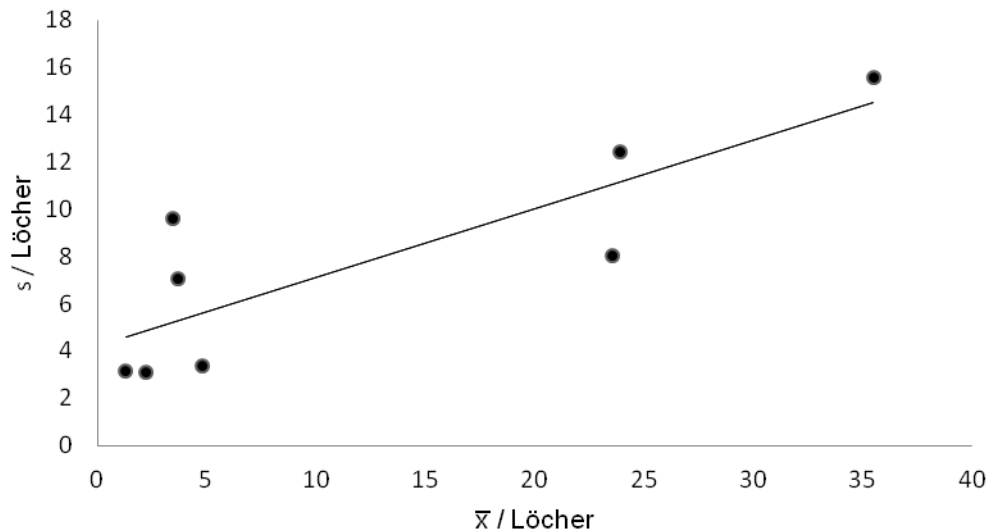


Abbildung 4.5.1: Korrelationsdiagramm zwischen der Standardabweichung s der Lochzahl und dem Mittelwert \bar{x} der Lochzahl bei der Auswertung der nativen Hahnen-Ejakulate.

Der Korrelationskoeffizient ($r = 0,846$) beweist die positive Korrelation zwischen Median und Standardabweichung ($p=0,004$).

4.5.2 Tiefgefrier-Sperma Hahn

Bei allen untersuchten Proben konnte die Penetration der Spermien durch die IPVM nachgewiesen werden. Die mit Tiefgefriersperma inkubierten Teile der IPVM wiesen die höchste Dichte von Hydrolyse-Löchern im Vergleich aller untersuchten Ejakulate auf (Abb. 4.5.2.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.2.1 dargestellt.

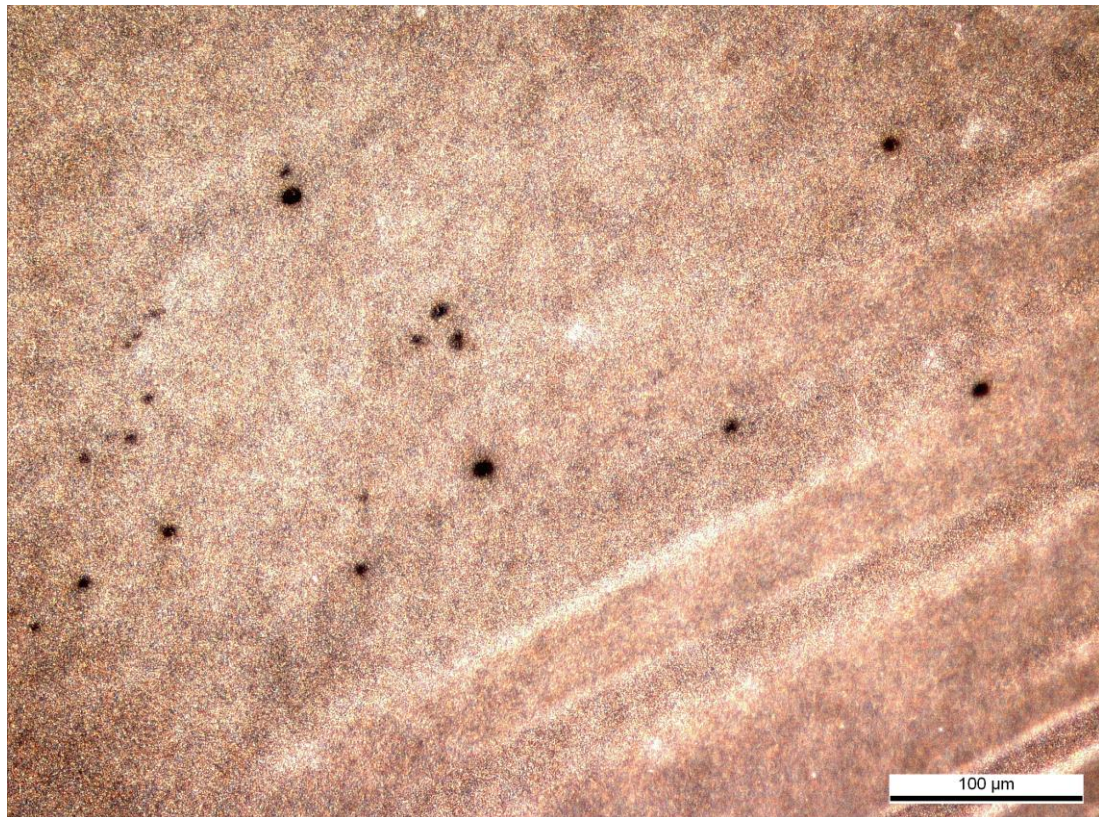


Abbildung 4.5.2.1: Durch TG-Hahnensperma entstandene Hydrolyse-Löcher in der IPVM von Hühnereiern

Tabelle 4.5.2.1: Ergebnisse des Perivitellinmembran-Penetrationstests mit Tiefgefrier-Sperma von Hähnen

Ejakulat Nr.	Summe Löcher	Anzahl Präparate > 300 Löcher	Präparate nicht auswertbar
1	1240	2	0
2	1244	0	1
3	720	0	1
4	529	0	3
5	185	0	0
6	1142	1	0
7	1048	1	1
8	1210	1	0
9	1075	0	0
10	684	0	0

Zur Darstellung der Abhängigkeit zwischen der Standardabweichung s und dem arithmetischen Mittelwert der Lochzahl \bar{x} wurde ein Korrelationsdiagramm erstellt (Abb. 4.5.2.2).

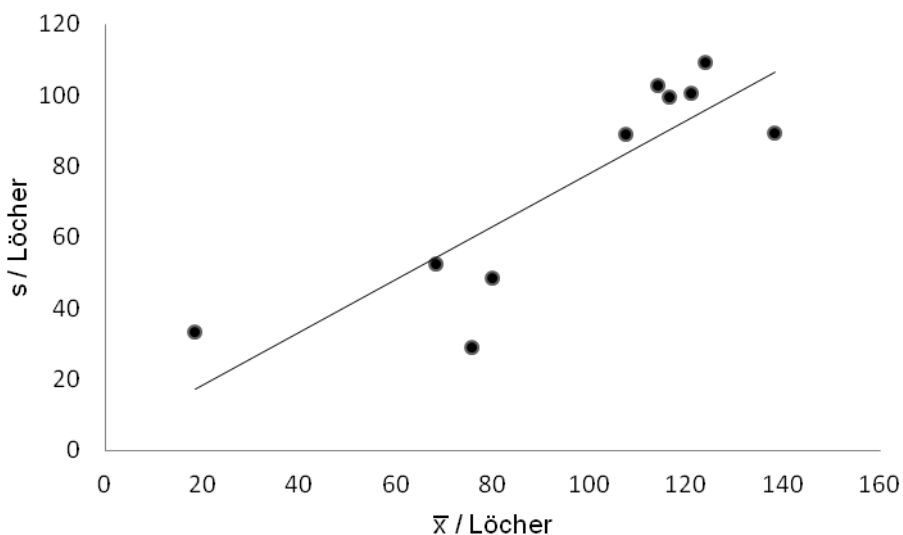


Abbildung 4.5.2.2: Korrelationsdiagramm zwischen der Standardabweichung s der Lochzahl und dem Mittelwert \bar{x} der Lochzahl bei der Auswertung der TG Hähnen - Ejakulate.

Der Korrelationskoeffizient ($r = 0,86$) beweist die positive Korrelation zwischen arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung, die mit einem Signifikanzniveau von $p=0,001$ als signifikant einzustufen ist.

4.5.3 Nativ-Sperma Nymphensittich

Nach der Inkubation mit nativem Ejakulat von Nymphensittichen konnte nur in 10% der untersuchten Proben der Nachweis von Hydrolyse-Löchern erbracht werden (Tabelle 4.5.3).

Tabelle 4.5.3: Ergebnisse des Perivitellinmembran-Penetrationstests mit Nymphensittich-Ejakulat

Ejakulat Nr.	Summe Lö- cher	Anzahl Präparate > 300 Löcher	Präparate nicht aus- wertbar
1	0	0	0
2	226	0	1
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0

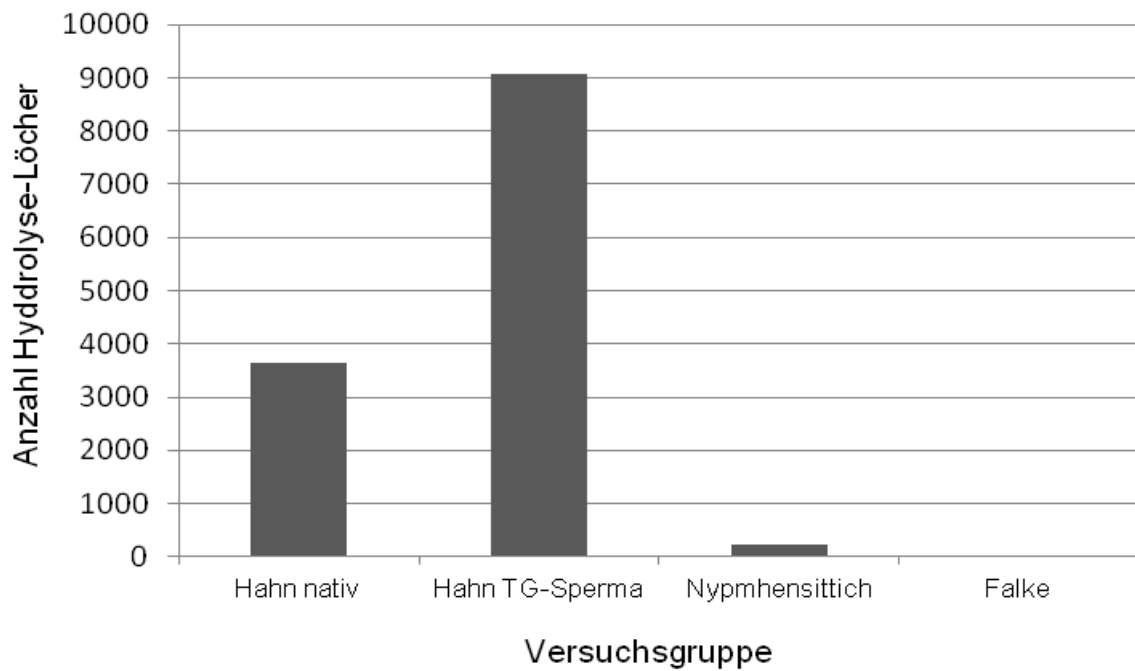
Jedes angefertigte Präparat konnte ausgewertet werden. Ein Präparat mit mehr als dreihundert Hydrolyse-Löchern lag nicht vor. Die durchgeführte Untersuchung lieferte keine statistisch auswertbaren Daten.

4.5.4 Nativ-Sperma Falke

Bei keiner der untersuchten Proben konnten durch die Penetration von Spermien verursachte Löcher in der Perivitellinmembran nachgewiesen werden. Aus diesem Grund war eine statistische Auswertung der Daten nicht möglich.

4.6 Vergleich der Spezies

Ein Vergleich der absoluten Anzahl der durch eindringende Spermien verursachten Löcher bei den verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abbildung 4.5.4.1 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Versuchsgruppe TG-Sperma Hahn die größte Anzahl an Hydrolyse-Löchern aufweist.



4.6.1: Vergleich der absoluten Anzahl der durch eindringende Spermien in der IPVM nachgewiesenen Löcher in allen Versuchsgruppen

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Mit der Etablierung eines Spermienfunktionstests für Falken und Papageien kann die Diagnostik im Hinblick auf männliche Sub- oder Infertilität verbessert werden. Eine Bedeutung hat dies vor allem für die Fortpflanzung wertvoller Einzeltiere. Dafür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Kann das Tier abgesamt werden (Boyd et al. 1977), ist ein in vitro Test zur Überprüfung der Spermaqualität durchführbar. Es ist als Nachteil anzusehen, dass das männliche Tier entweder auf die Absamung trainiert sein muss (Berry 1972, Gee 1983), oder es durch die Samenentnahme mittels Abdominalmassage (Burrows & Quinn 1935, Burrows & Quinn 1937, Schramm 2005) zur Verunreinigung des Ejakulats kommen kann.

Eine weitere Möglichkeit ist es, die Imprägnation der Spermien in die Eizelle zu überprüfen. Als Beweis dafür können Löcher in der IPVM angesehen werden. Werden die Eier bebrütet und bei Ausbleiben einer Fruchtanlage untersucht, könnte ein Hinweis auf die Stufe im Fortpflanzungsprozess gefunden werden, auf der es zur Unterbrechung der natürlichen Vorgänge kommt, ohne dass zuvor potentiell befruchtete Eier verwendet werden müssen.

Unbefruchtete Eier seltener Spezies stehen in der Regel nicht zur Untersuchung zur Verfügung. Analog zum sog. Hamster-Oocyten-Penetrationstest, bei dem die Penetrationsfähigkeit humaner Spermien mittel Hamster Oocyten getestet wird (Yanagimachi et al. 1976), sollte untersucht werden, ob sich ein modifizierter Perivitellinmembran-Penetrationstest etablieren lässt, mit dem die Penetrationsfähigkeit von Spermien anderer Vogelspezies anhand der aus Hühnereiern isolierten IPVM überprüft werden kann. Hintergrund ist, dass in früheren Arbeiten eine Interspezies-Interaktion von Spermien mit der inneren Perivitellinmembran nachgewiesen werden konnte (Stewart et al. 2004, Win et al. 2005).

Da bei Vögeln wertvoller oder seltener Arten unbefruchtete, unbebrütete Eier zu Versuchszwecken nicht zur Verfügung stehen, sollte überprüft werden, inwiefern sich die IPVM aus Hühnereiern als Testmedium für Spermien von Falken, als Beispiel für Greifvögel, und Nymphensittichen, als Beispiel für Papageien eignet. Informationen liegen bisher zu diesem Aspekt nicht vor.

5.2 Diskussion der Methode

Die innere Perivitellinmembran ist in der Literatur mehrfach verwendet worden, um morphologische und funktionelle Eigenschaften von Vogelspermien wissenschaftlich zu untersuchen (Barbato et al. 1998, Kasai et al. 2000). Sie kann auch nach der Eiablage aus dem Ei isoliert werden (Kido & Doi 1988). Haben Spermien diese penetriert, können die dadurch entstandenen Löcher unter dem Dunkelfeldmikroskop nachgewiesen werden (Barbato et al. 1998, Birkhead et al. 1994).

Isoliert man die IPVM aus unbefruchteten Eiern, kann die Bindung und Penetration von Spermien auch in vitro induziert werden (Bramwell & Howarth 1992). Die mittels Säurehydrolyse aus gelegten Eiern separierte IPVM hat vergleichbare Bindungseigenschaften, wie die aus frisch ovulierten Eiern entnommene IPVM (Robertson et al. 1997). Demnach kann die isolierte IPVM als Testmedium für die Penetrationsfähigkeit von Spermien verwendet werden.

Löcher in der IPVM können nicht als Beweis für die Befruchtung angesehen werden, da diese als die Verschmelzung von männlichen und weiblichen Keimzellen definiert ist (Schnorr & Kressin 2006). Sie belegen lediglich die Bindungs- und Penetrationsfähigkeit der Spermien. Da diese jedoch neben der Abgabe in den weiblichen Genitaltrakt, den Transport zum Ort der Befruchtung und der Akrosomenreaktion zentrale Elemente im Rahmen der Fortpflanzung darstellen, liefert der durchgeführte Test wertvolle Informationen über die funktionelle Aktivität von Spermien einer Probe. Die Zählung von Hydrolyse-Löchern in der IPVM ist nach der Untersuchung von Staines et al. (1998) besser zur Ermittlung der Fruchtbarkeit geeignet, als die Quantifizierung der in der äußeren Perivitellinmembran eingeschlossenen Spermien.

Der Perivitellinmembran-Penetrationstest stellt sich als einfach und kostengünstig für einen funktionellen Spermienfunktionstest dar und sollte daher in der vorliegenden Untersuchung weiterentwickelt werden.

5.2.1 Versuch 1: Präparationsmodifikation

Die Separation der inneren von der äußeren Perivitellinmembran wurde mittels Säureinkubation (Kido & Doi 1988) durchgeführt. Das etablierte Inkubationsprotokoll beinhaltet die Verwendung von 0,01 molarer Salzsäure bei einer Inkubationszeit von 60

Minuten. Um die Arbeit unter Praxisbedingungen effizienter gestalten zu können, wäre eine Verkürzung der Inkubationszeit wünschenswert. Im vorliegenden Versuch wurde das Standardprotokoll dementsprechend variiert. Die Inkubationszeit wurde um die Hälfte reduziert, während die Säurekonzentration um den Faktor zehn erhöht wurde.

5.2.2 Versuch 2: Haltbarkeitsstudie

Die für einen Perivitellinmembran-Penetrationstest zur Verfügung stehenden Eier sind häufig unterschiedlich alt und werden nicht immer unter gleichen Bedingungen gelagert. Um den Einfluss verschiedener Lagerungsparameter auf die Separationseigenschaften im PVPT untersuchen zu können, wurden die verwendeten Eier unter definierten Bedingungen gelagert und mittels Säurehydrolyse die Separation induziert. Die verwendeten Parameter waren die Lagerungstemperatur, der Lichteinfluss und die Lagerungsdauer. Der einzige Parameter, für den sich ein statistisch signifikanter Einfluss nachweisen ließ, war die Lagerungsdauer. Temperatur und Lichteinfluss hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Separationserfolg, allerdings ist bei Lagerung in Dunkelheit und Kühlschranktemperatur die Separation über den längsten Zeitraum erfolgreich.

5.2.3 Versuch 3: Bebrütungsversuch

Da die Frage nach der Penetrationsfähigkeit von Spermien häufig im Raum steht, wenn bei bereits inkubierten Eiern keine Entwicklung eines Embryos stattfindet, wurde die Anwendbarkeit der Säureinkubationsmethode als Möglichkeit zum Nachweis penetrationsbedingter Löcher an bebrüteten Eiern getestet. Von besonderem Interesse ist dies für bedrohte Vogelarten, wie den Spix-Ara (Fischer et al. 2014), die Königsamazonie (Russello et al. 2001) oder den Rabenkakadu (King et al. 2000). Durch diese Technik ließe sich bei in- und subfertilen Zuchtpaaren eine Aussage zur männlichen Fertilität treffen. Es wurden befruchtete und unbefruchtete Hühnereier unter analogen Bedingungen bebrütet und über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht. Die Separation der inneren von der äußeren Perivitellinmembran wurde unter dem Stereomikroskop überprüft. Die Anwendung bei bebrüteten Eiern, die befruchtet sind, wurde durch den sich entwickelnden Embryo limitiert. Dies ist nur ein-

geschränkt mit Untersuchungen unter Praxisbedingungen vergleichbar, da hier nur diejenigen Eier untersucht werden, die beim Schieren als leer auffallen. Daher wurden zusätzlich auch diese Eier untersucht. Es stellt sich heraus, dass die Separation der inneren von der äußeren PVM nach dem zweiten Tag der Bebrütung, unabhängig vom Befruchtungsstatus nicht mehr möglich ist. Demnach muss ein anderer Weg beschritten werden, um das Eindringen von Spermien nachzuweisen.

5.2.4 Versuch 4: Bebrütung von Eiern anderer Spezies

Die Anwendbarkeit der Säurehydrolyse zur Separation der IPVM bei anderen Vogel-spezies wurde in der Literatur bereits vielfach angewendet (Kasai et al. 2000, Robertson et al. 1998) und in diesem Versuch ebenfalls getestet. Untersucht wurden Eier, die nach Möglichkeit unbebrütet waren und sobald als möglich dunkel und bei Kühlschranktemperatur gelagert wurden.

5.2.5 Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest

Die aus unbebrüteten, unbefruchteten Hühnereiern isolierte innere Perivitellinmembran wurde verwendet, um die Penetrationsfähigkeit verschiedener Spermien zu überprüfen. Diese eignet sich als Modell, da die morphologischen und funktionellen Eigenschaften durch die Passage des Legedarms, die Entwicklung der umgebenden Membranen und Eibestandteile sowie die Eiablage im Bezug auf die Bindung und Hydrolyse von Spermien nicht beeinträchtigt werden (Robertson et al. 1997). Verwendet wurden natives und tiefgefrorenes Hahnenejakulat sowie natives und flüssig-verdünntes Ejakulat von Nymphensittichen und Falken. Kleine Anteile der isolierten Membran wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium® mit einer Spermaportion inkubiert (Robertson et al. 1997) und anschließend das Vorhandensein von Hydrolyse-Löchern im Dunkelfeld überprüft. Die Versuchsreihen mit Hahnenejakulat wurden als Kontrollgruppe für einen funktionierenden Versuchsaufbau verwendet. Die Ejakulate wurden zum Teil nativ, zum Teil flüssigkonserviert verwendet.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Versuch 1: Präparationsmodifikation

An den Ergebnissen wird deutlich, dass die Separationseigenschaften sowohl durch die Verkürzung der Inkubationszeit, als auch durch die Erhöhung der Säurekonzentration verschlechtert werden.

Der beste Separationserfolg wurde bei Präparation nach Protokoll I erzielt. Wenn die Separation der inneren von der äußeren Perivitellinmembran über Hydrolyse erfolgt, wird die Reaktion durch Temperaturerhöhung und H^+ - Ionen katalysiert. Bei einer Erhöhung der Säurekonzentration auf 0,1 Mol/l war die Separation jedoch bei keinem der Eier nachweisbar. Die Säure gilt als einer der Katalysatoren der Hydrolyse, das pH-Optimum für die Separation der PVM, das nach den Untersuchungen von Kido und Doi (1988) bei 1,8 - 2,0 liegt, wird bei einer Säurekonzentration von 0,1 Mol/l allerdings unterschritten.

Kido und Doi vermuten weiterhin, dass die Separation nicht durch biochemische Prozesse, sondern durch den osmotischen Wassereinstrom in die Dotterkugel und die damit verbundene Ausdehnung erfolgt. Demnach würde der Separationsprozess nicht enzymatisch, sondern mechanisch induziert. Eine Reduktion der Inkubationszeit auf 30 Minuten verminderte den Separationserfolg um 20%. Die schlechteren Separationsergebnisse bei verkürzter Inkubationszeit lassen sich durch die verringerte Ausdehnung der Dotterkugel erklären, da der Wassereinstrom zeitabhängig ist.

Auf Grundlage der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass das in der Literatur etablierte Inkubationsregime nach Kido und Doi (1988) die Methode der ersten Wahl darstellt.

5.3.2 Versuch 2: Haltbarkeitsstudie

Die Ergebnisse der Haltbarkeitsstudie beweisen, dass der Zeitraum, in dem eine Separation der IPVM mittels Säureinkubation möglich ist, in Abhängigkeit zur Lagerdauer der Eier variiert. Bei den Eiern, die bei Raumtemperatur und -beleuchtung gelagert wurden, war eine Separation nur bis drei Tage nach Untersuchungsbeginn möglich. Auch eine Verlängerung der Säureinkubationszeit, die normalerweise die

Separation hervorruft, führte nicht zu einer Verbesserung des Separationserfolgs. Über einen Zeitraum von zwei Wochen war eine zufriedenstellende Separation der bei Kühlschranktemperatur und Dunkelheit gelagerten Eier möglich. Die Lagerung bei Dunkelheit und Raumtemperatur führte zu durchweg schlechten Separationsergebnissen. Statistisch signifikant war der Einfluss auf die Separation jedoch nur für die Lagerungsdauer.

Für die Parameter Lichteinwirkung und Temperatur ist der nachgewiesene Einfluss nicht signifikant. Um die sich abzeichnende Tendenz, dass die Lagerung bei Dunkelheit und Kühlschranktemperatur am besten zur Erhaltung der Separationsfähigkeit geeignet ist, zu erhärten, müsste eine Untersuchung mit einem größeren Probenkollektiv erfolgen. Trotzdem lässt sich anhand der Ergebnisse schlussfolgern, dass die Lagerung im Kühlschrank erfolgen sollte. Da die Separation bei den dunkel und kühl gelagerten Eiern am längsten möglich war, wurden die Eier in allen folgenden Versuchen bei Dunkelheit und Kühlschranktemperatur gelagert.

5.3.3 Versuch 3: Bebrütungsversuch

Eine Separation der IPVM konnte nur bis zum ersten Tag nach Beginn der Bebrütung bei den befruchteten und unbefruchteten Eiern durchgeführt werden. Da die Separation nach mehr als vierundzwanzig Stunden Inkubationszeit weder bei befruchteten, noch bei unbefruchteten Eiern möglich war, ist diese Methode nicht dazu geeignet, retrospektiv die Penetrationsfähigkeit der Spermien zu detektieren. Die Möglichkeit, bei Eiern, die beim Schieren als leer detektiert werden, die Spermienpenetration nachzuweisen, ist mit der verwendeten Methode nicht gegeben. Bei den befruchteten Eiern war die fortschreitende Entwicklung des Embryos limitierend, für die Durchführung. Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen von Birkhead et al. (2008), die bebrütete Eier von Zebrafinken untersucht haben. Zur Ermittlung der Penetration von Spermien wurde in deren Studie das Vorliegen von Zellkernen in der Region der Keimscheibe überprüft, da die Perivitellinmembran durch den fortschreitenden Bebrütungsvorgang zersetzt wurde und nur noch sehr kleine Anteile für die Untersuchung zur Verfügung standen.

5.3.4 Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Vogelspezies

Außer mit den Eiern der Spezies Huhn, wurde die Säureinkubation zur Separation der IPVM in der Literatur bei einigen weiteren Vogelspezies angewandt: Nebraska-Spot Truthuhn, Fasan (*Phasianus colchicus*), Graugans-Hybriden (*Anser anser*), Khaki-Campbell Ente, Peking Ente und Zebrafink (*Taeniopygia guttata*) (Kasai et al. 2000, Stewart et al. 2004).

Die in der vorliegenden Untersuchung erzielten, schlechten Ergebnisse bei der Untersuchung der Falkeneier könnten damit zusammenhängen, dass alle untersuchten Eier bereits bebrütet worden waren (Birkhead et al. 2008). An den Ergebnissen des Bebrütungsversuchs wird deutlich, dass die Säureinkubationsmethode bei bebrüteten Eiern nicht zufriedenstellend funktioniert. Demzufolge ist die mangelhafte Separation weniger auf die Spezies als vielmehr auf die Untersuchungsumstände zurückzuführen. Ob die Separation der IPVM mittels Säureinkubation induziert werden kann, müsste in einem Versuchsaufbau mit unbebrüteten Falkeneiern überprüft werden. Warum bei der Inkubation der Eier von Gänsen und Nymphenstittchen keine Separation der IPVM gelungen ist, bleibt unklar. Es ist aufgrund der vorgestellten Resultate davon auszugehen, dass eine Separation bei diesen Spezies nicht mit dem angewandten Protokoll durchgeführt werden kann. Die Beobachtung, dass die Separation der Perivitellinmembranen nicht bei allen Vogelspezies mittels Säurehydrolyse möglich ist, deckt sich mit den Untersuchungen von Stewart et al. (2004).

5.3.5 Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest

Der Nachweis von Hydrolyse-Löchern in der IPVM bei den Untersuchungen mit flüssigkonserviertem, sowie tiefgefrorenem Hahnenejakulat beweist, dass die Bindungs- und Penetrationsfähigkeit der Membran trotz der vorherigen Aufbereitung erhalten geblieben ist. Üblicherweise ist die Spermaqualität des nativen Ejakulats besser, als von kryokonserviertem Ejakulat. Dies liegt an der Reduktion der Aktivität durch den Einfrier- und Auftauprozess (Long 2006). Die Qualität des Ejakulats bemisst sich anhand der Anzahl der eindringenden Spermien, die in Form von Hydrolyse-Löchern erfasst wird (Staines et al. 1998). In den durchgeführten Versuchen war die Anzahl an Hydrolyse-Löchern mit tiefgefrorenem Hahnenejakulat durchweg größer, als mit Frischsperma. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Die Spermaproben der Na-

tiv-Gruppe stammten von Hähnen, die zwischenzeitlich mit einer Gruppe weiblicher Tiere vergesellschaftet und im Deckeinsatz waren. Zusätzlich fanden die Absamungen nicht in immer gleichem zeitlichem Abstand statt. Die Proben der TG-Gruppe stammten von ausschließlich zur Samengewinnung gehaltenen, trainierten Tieren des Instituts für Nutztiergenetik des FLI in Mariensee. Da die Ejakulatqualität auch mit der Frequenz der Spermagewinnung korreliert (Lorenz et al. 1955, Malecki et al. 1997, Mc. Daniel & Sexton 1977, Noirault & Brillard 1999, Riaz et al. 2004) könnte hier ein ursächlicher Zusammenhang bestehen.

Zusätzlich war die Dichte und Gesamtspermienzahl in den TG-Proben durch Poolen der Proben und die Standardisierung vor der Kryokonservierung deutlich höher, als in den nativen Ejakulaten.

Da es nur in sehr geringem Maße zur Interaktion der IPVM mit den Spermien der Nymphensittiche kam und bei den Untersuchungen mit Falkensperma gar keine verwertbaren Ergebnisse erzielt wurden, ist vergleichbar mit den Untersuchungen von Stewart et al. (2004). In der zitierten Studie wurden Interaktionsgrade von Hahnensperma mit der IPVM verschiedener Vogelarten untersucht. Die Interaktion sank analog zur phylogenetischen Verwandtschaft. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, konnte eine geringe Interaktion jedoch in allen untersuchten Kombinationen nachgewiesen werden.

5.4. Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifizierter Perivitellinmembran-Penetrationstest im eigenen Labor etabliert. Dadurch wird die Infertilitätsdiagnostik im Hinblick auf die Penetrationsfähigkeit aviärer Spermien verbessert. Dadurch ist es möglich, bei unbebrüteten Eiern festzustellen, ob die Imprägnation von Spermien in die Oocyte stattgefunden hat.

Ein neuer Versuchsansatz war die Nutzung der aus Hühnereiern isolierten IPVM als Modell für Spermien von Papageien und Falken, um potentiell befruchtungsfähige Eier dieser Arten nicht für einen Funktionstest verwenden zu müssen. Dieser Versuchsaufbau lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. Ob die Variation des Untersu-

chungsprotokolls oder die Verwendung der IPVM phylogenetisch näher verwandter Vogelarten die Resultate verbessert, müsste in weiteren Versuchen ermittelt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Perivitellinmembran-Penetrationstest als Spermienfunktionstest eine vielversprechende Ergänzung zur Spermauntersuchung darstellt, die hauptsächlich morphologische Abweichungen des Ejakulats erfasst, jedoch keine weitergehende Aussage auf die funktionelle Aktivität einer Spermaprobe liefert. Gerade im Hinblick darauf, dass momentan ca. 13% aller Vogelarten von der IUCN als gefährdet eingestuft werden (IUCN Red List 20151) und die Fortpflanzung in Gefangenschaft gehaltener, seltener Vogelarten besonders problematisch ist, sollten die Möglichkeiten zur Optimierung assistierter Reproduktionstechniken kontinuierlich verbessert werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, einen Spermienfunktionstest zu etablieren, bei dem die separierte innere Perivitellinmembran (IPVM) als Testmedium für die Penetrationsfähigkeit von Spermien anderer Vogelspezies verwendet werden kann. Die zur Separation der IPVM verwendete Säureinkubationsmethode wurde in einem Vorversuch variiert, um die Separationseigenschaften von Hühnereiern bei Veränderungen der Inkubationszeit und der Säurekonzentration zu erfassen. Zusätzlich wurden die zu untersuchenden Eier verschiedenen Lagerungsbedingungen unterzogen, um den Einfluss der Lagerung auf die Separationseigenschaft zu untersuchen. Außerdem wurde die Säureinkubation zur Separation der IPVM bei Eiern sechs weiterer Vogelspezies angewendet.

Die Anwendbarkeit der Säureinkubationsmethode bei bereits bebrüteten Eiern wurde in einem Versuch mit befruchteten und unbefruchteten Hühnereiern getestet, die bei 55% Luftfeuchtigkeit und 37°C über einen Untersuchungszeitraum von sieben Tagen bebrütet wurden.

Im Perivitellin-Membran-Penetrationstest wurde die IPVM aus Hühnereiern isoliert und mit nativem und kryokonserviertem Hahnenejakulat, sowie nativem und flüssigkonserviertem Ejakulat von Falken und Nymphensittichen inkubiert. Die Penetrationsfähigkeit wurde anhand des Vorliegens von Hydrolyse-Löchern in der IPVM überprüft.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Die besten Separationsergebnisse wurden mit dem Inkubationsprotokoll mit 0,01 molarer Salzsäure erzielt. Zwischen den beiden verwendeten Salzsäurekonzentrationen war der nachgewiesene Separationserfolg signifikant different. Zwischen der Inkubationszeit von 30 und 60 Minuten konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Separationserfolgs ermittelt werden.
- Im Bezug auf den Einfluss der Lagerung konnte nur für die Lagerungsdauer, nicht für die Lagerungstemperatur und die Lichteinwirkung, ein statistisch signifikanter Einfluss auf den Separationserfolg nachgewiesen werden.
- Die Bebrütungsdauer der Eier vor Separation hatte einen signifikanten Einfluss auf die Anwendung der Säureinkubationsmethode. Die Separation war ausschließlich

bis zu einem Tag nach Beginn der Bebrütung möglich. Der Unterschied zwischen den befruchteten und unbefruchteten Eiern war nicht signifikant.

- Bei der Untersuchung von Eiern anderer Vogelspezies außer dem Huhn konnte die IPVM aus Eiern von Hausgans und Nymphensittich nicht isoliert werden. Bei den Falkeneiern war die Separation nur bei 20% der Proben erfolgreich. Bei Fasanen-, Wachtel- und Laufenteneiern wurde die Separation der IPVM mit mindestens 40% Erfolgsquote erzielt.
- Im Perivitellinmembran-Penetrationstest konnten durch eindringende Spermien verursachte Hydrolyse-Löcher in der aus Hühnereiern isolierten IPVM bei der Inkubation mit nativem und tiefgefrorenem Hahnensperma nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung mit Nymphensittich-Sperma gelang der Nachweis nur bei 10% der untersuchten Proben. Mit dem verwendeten Falkenejakulat kam es bei keiner der untersuchten Proben zu einer nachweisbaren Penetration von Spermien durch die IPVM von Hühnereiern.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich der Perivitellinmembran-Penetrationstest mit aus Hühnereiern isolierter IPVM nicht zum Nachweis der Penetrationsfähigkeit von Falkenejakulat und nur in sehr eingeschränktem Maße für Nymphensittichejakulat eignet. Ein speziesübergreifender Penetrationstest ließ sich nicht etablieren.

7 Summary

The aim of this study was to establish a functional sperm assay which uses the inner perivitelline layer (IPVM) of chicken eggs as a model to test the penetration ability of spermatozoa of other avian species. The acid hydrolysis used to separate the IPVM was varied in a preliminary test to investigate the separation ability of chicken eggs in accordance to acid concentration and incubation period. Furthermore the eggs were stored under different conditions to explore the influence of storage on the separation. Moreover the acid hydrolysis was applied to eggs of six other avian species.

The possibility to use the acid hydrolysis in hatched eggs was investigated in a trial with fertilized and unfertilized chicken eggs which were hatched at 37°C and 55% humidity for seven days.

In the perivitelline membrane penetration assay the IPVM isolated from chicken eggs was incubated with fresh and frozen-thawed chicken spermatozoa and fresh and diluted spermatozoa of falcons and cockatiels. Penetration of spermatozoa was tested by visualization of holes in the IPVM after incubation.

The following relevant results were achieved:

- The best separation of the IPVM was obtained with an acid concentration of 0,01 mol hydrochloric acid. There was a significant difference between the two tested acid concentrations. Between the incubation periods (30 minutes, 60 minutes) the difference of successful separation was not significant.
- For storage conditions only the time of storage had a significant influence on the separation success. Neither temperature, nor light exposure had such an effect.
- Time of hatching before separation had a significant influence on the application of acid hydrolysis. The separation was only induced up to one day after hatching. The difference between fertilized and unfertilized eggs was not significant.
- Testing eggs from other avian species no separation was achieved in eggs of goose and cockatiel. With falcon eggs the separation was only induced in 20% of the samples. At least 40% of samples were tested successful in eggs of pheasant, fowl and duck.

- In the perivitelline membrane penetration assay holes produced by penetrating spermatozoa were found in the chicken IPVM after incubation with native and frozen-thawed cock sperm. With the cockatiel ejaculates holes were only found in 10% of the samples. Falcon spermatozoa did not produce any visible holes in the chicken IPVM at all.

The present study shows that the perivitelline membrane penetration assay from chicken eggs is not suitable to investigate the penetration ability of falcon spermatozoa. The appropriateness for cockatiel spermatozoa is severely restricted. A species-comprehensive perivitelline membrane penetration assay was not established.

8 Literaturverzeichnis

- Bakst, M. R.; Howarth, B. [JR.] 1977: Hydrolysis of the Hen's Perivitelline Layer by Cock Sperm in vitro. *Biology of Reproduction* 17, 370–379.
- Barbato, G. F.; Cramer, P. G.; Hammerstedt, R. H. 1998: A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of Reproduction* 58 (3), 686–699.
- Barrat, C. L. R.; Osborn, J. C.; Harrison, P. E.; Monks, N.; Dunphy, B. C.; Lenton, E. A.; Cooke, I. D. 1989: The hypo-osmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. *Human Reproduction* 4, 430–434.
- Berry, R. B. 1972: Reproduction by artificial insemination in captive American goshawks. *The Journal of Wildlife Management*, 1283–1288.
- Bhattacharya, S. M. 2010: Hypo-osmotic swelling test and unexplained repeat early pregnancy loss. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 36 (1), 119–122.
- Birkhead, T. R.; Hall, J.; Schut, E.; Hemmings, N. 2008: Unhatched eggs: methods for discriminating between infertility and early embryo mortality. *International Journal of Avian Science* 150, 508–517.
- Birkhead, T. R.; Moeller, A. 1992: Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. *Biological Journal of the Linnean Society* 45, 363–372.
- Birkhead, T. R.; Sheldon, B. C.; Fletcher, F. 1994: A comparative study of sperm-egg interactions in birds. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 353–361.
- Blanco, J. M.; Gee, G.; Wildt, D. E.; Donoghue, A. M. 2000: Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and Peregrine Falcon Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 63 (4), 1164–1171.
- Blanco, J. M.; Wildt, D. E.; Höfle, U.; Voelker, W.; Donoghue, A. M. 2009: Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology* 7, 200–213.
- Bongalhardo, D.; Flores, A.; Severo, V.; Gonzalez, V.; Miranda, R.; Corcini, C.; Curcio, B.; Costa, S.; Deschamps, J. 2009: Vitriification of the inner perivitelline layer of chicken eggs for use in the sperm-egg interaction assay. *Theriogenology* 72 (2), 198–202.
- Boyd, L. L.; Boyd, N. S.; & Dobler, F. C. 1977: Reproduction of prairie falcons by artificial insemination. *The Journal of Wildlife Management*, 266–271.
- Bramwell, R. K.; Howarth, B. 1992: Cross-Reactivity of Sperm-Binding Proteins from Chicken, Turkey and Duck Oocytes. *Poultry Science* 71 (11), 1927–1932.

- Bramwell, R. K.; Howarth, B. [JR] 1992: Preferential Attachment of Cock Spermatozoa to the Perivitelline Layer Directly over the Germinal Disc of the Hen's Ovum. *Biology of Reproduction* 47 (6), 1113–1117.
- Burrows, W. H.; Quinn, J. P. 1935: A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl. *Poultry Science* 14 (4), 251–254.
- Burrows, W. H.; Quinn, J. P. 1937: The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science* 16 (1), 19–24.
- Chaudhuri, D.; Wishart, G. J. 1988: Predicting the Fertilizing Ability of Avian Semen: The Development of an objective colourimetric Method for Assessing the Metabolic Activity of Fowl Spermatozoa. *British Poultry Science* 29, 837–845.
- Check, J. H.; Katsoff, D.; Check, M. L. 2001: Some semen abnormalities may cause infertility by impairing implantation rather than fertilization. *Medical Hypotheses* 56 (5), 653–657.
- Check, J. H.; Stumpo, L.; Lurie, D.; Benfer, K.; Callan, C. 1995: A comparative prospective study using matched samples to determine the influence of subnormal hypo-osmotic test scores of spermatozoa on subsequent fertilization and pregnancy rates following in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)* 10 (5), 1197–1200.
- Correa, J.; Zavos, P. 1994: The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42, 351–360.
- Cytel Studio LogXact Vers. 9.0.0 2010. *Statistical Software for Regression Procedures featuring Exact Methods, User Manual*, CYTEL Inc., Cambridge MA 02139, USA.
- Cytel Studio StatXact 9.0.0 2010. *Statistical Software for Exact Nonparametric Interference, User Manual*, CYTEL Inc., Cambridge MA 02139, USA.
- Dixon, W. (Hg.) 1993: *BMDP Statistical Software Manual*, University of California Press.
- Dumpala, P. R.; Parker, H. M.; McDaniel, C. D. 2006: Similarities and Differences Between the Sperm Quality Index and Sperm Mobility Index of Broiler Breeder Semen. *Poultry Science* 85, 2231–2240.
- Fischer, D.; Neumann, D.; Purchase, C.; Bouts, T.; Meinecke-Tillmann, S.; Wehrend, A.; Lierz, M. 2014: The use of semen evaluation and assisted reproduction in Spix's macaws in terms of species conservation. *Zoo biology* 33 (3), 234–244.
- Florman, H.; Ducibella, T. *Fertilization in Mammals*. In: Neill, J.D. (Hg.) 2006: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 3rd Edition*, Elsevier Academic Press, 55–113.

- Froman, D. P.; Feltmann, A. J. 1998: Sperm Mobility: A Quantitative Trait of the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* 58, 379–384.
- Froman, D. P.; Feltmann, A. J.; McLean, D. 1997: Increased Fecundity Resulting from Semen Donor Selection Based Upon In Vitro Sperm Motility. *Poultry Science* 76, 73–77.
- Froman, D. P.; Feltmann, A. J.; Rhoads, M. L.; Kirby, J. D. 1999: Sperm Mobility: A Primary Determinant of Fertility in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* 61, 400–405.
- Froman, D. P.; McLean, D. 1996: Objective measurement of sperm motility based upon sperm penetration of Accudenz. *Poultry Science* 75 (6), 776–784.
- Gee, G. F. 1983: Avian artificial insemination and semen preservation. In: IFCB Symposium on breeding birds in captivity.
- Gerstberger, R.; Barth, S. W. *Reproduktion beim Vogel*. In: Engelhardt, W.; Breves, G. (Hrsg.) 2005: *Physiologie der Haustiere*, Enke, 555–571.
- Gill, S. P.; Donoghue, A. M.; Holsberger, D.R.; Amann, R.P.; Hulet, R.M. 1999: Identifying Potentially Subfertile Toms via a Sperm-Binding Assay. *Poultry Science* 78 (8), 1208–1218.
- Hazary, R. C.; Chaudhuri, D.; Wishart, G. J. 2001: Application of an MTT reduction assay for assessing sperm quality and predicting fertilizing ability of domestic fowl semen. *British Poultry Science* 42 (1), 115–117.
- Howarth, B. 1981: Preservation of the Fertilizing Capacity of Cock Semen Incubated In Vitro at 41 C. *Poultry Science* 60, 1075–1078.
- Howarth, B. 1992: Carbohydrate Involvement in Sperm-EGG Interaction in the Chicken. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 12 (2), 255–265.
- IUCN 2015: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2 www.iucnredlist.org, Zugriff August 2015.
- Jeyendran, R. S.; van der Ven, H. H.; Prerez-Pelaez, M.; Crabo, B. G.; Zaneveld, L. J. D. 1984: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70 (1), 219–228.
- Kasai, K.; Izumo A.; Inaba T.; Sawada, T. 2000: Assessment of fresh and stored duck spermatozoa quality via in vitro sperm-egg interaction assay. *Theriogenology* 54 (2), 283–290.
- Kido, S.; Doi, Y. 1988: Separation and Properties of the Inner and Outer Layers of the Vitelline Membrane of Hen's Eggs. *Poultry Science* 67 (3), 476–486.

- King, C. E.; Heinhuis, H., Brouwer, K. 2000: Management and husbandry of black cockatoos *Calyptrorhynchus* spp in captivity. *International Zoo Yearbook* 37 (1), 87–116.
- Kurni-Diaka, J. 1993: Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39, 1279–1289.
- Lechinak, D.; Kedzierski, A.; Stanislawski, D. 2002: The Use of HOS Test to Evaluate Membrane Functionality of Boar Sperm Capacitated in vitro. *Reproduction of Domestic Animals* 37, 379–380.
- Lepore, P. D.; Marks, H. L. 1966: Intravaginal Insemination of Japanese Quail. Factors Influencing the Basic Technique. *Poultry Science* 45 (5), 888–891.
- Long, J. 2006: Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science* 85, 232–236.
- Lorenz, F. W.; Wilson, N. E.; Asmundson, V.S. 1955: Relation of Frequency of Collection to Amount of Semen Obtained from Turkey Males. *Poultry Science* 34 (3), 634–639.
- Malecki, I.; Martin, G.; Lindsay, D. 1997: Semen production by the emu (*Dromaius novaehollandiae*). 2. Effect of collection frequency on the production of semen and spermatozoa. *Poultry Science* 76 (4), 622–626.
- Malecki, I. A.; Cloete, S. W. P.; Gertenbach, W. D.; Martin, G.B. 2004: Fertility of female ostriches (*Struthio camelus*). *South African Journal of Animal Science* 34 (3), 158–165.
- Malecki, I. A.; Martin, G. 2005: *Reproductive technologies for ratite farming*, Western Australia, 10-16.
- Marvan, F.; Rob, O.; Janecková, E. 1981: Die Klassifikation morphologischer Spermienanomalien bei Gantern. *Zuchthygiene* 16, 176–183.
- Mc Intyre, D. R.; Christensen, V. L. 1985: Effect of Initial Insemination and Insemination Interval on Fertility in Turkey Hens. *Poultry Science* 64 (8), 1549–1552.
- Mc. Daniel, G. R.; Sexton T. J. 1977: Frequency of Semen Collection in Relation to Semen Volume, Sperm Concentration and Fertility in the Chicken. *Poultry Science* 56 (6), 1989–1993.
- McDaniel, C. D.; Hannah, J. L.; Parker, H. M.; Smith, T. W.; Schultz, C. D.; Zumwalt, C. D. 1998: Use of a Sperm Analyzer for Evaluating Broiler Breeder Males. 1. Effects of Altering Sperm Quality and Quantity on the Sperm Motility Index. *Poultry Science* 77, 888–893.
- Neild, D.; Chaves, G.; Flores, M.; Mora, N.; Beconi, M.; Aguero, A. 1999: Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51, 721–727.

- Neuman, S. L.; McDaniel, C.; Frank, L.; Radu, J.; Einstein, M. E.; Hester, P. Y. 2002: Utilisation of a sperm quality analyser to evaluate sperm quantity and quality of turkey breeders. *British Poultry Science* 43 (3), 457–464.
- Neumann, D.; Kaleta, E. F., Lierz, M. 2013: Semen collection and artificial insemination in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) - A potential model for psittacines. *Tierärztliche Praxis Kleintier* 2, 101–105.
- Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. 2004: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band V. Anatomie der Vögel*, 3.Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, 224–264.
- Noirault, J.; Brillard, J. 1999: Effects of frequency of semen collection on quantitative and qualitative characteristics of semen in turkey breeder males. *Poultry Science* 78 (7), 1034–1039.
- Okamura, F.; Nishiyama, H. 1978: The Passage of Spermatozoa through the Vitelline Membrane in the Domestic Fowl, *Gallus gallus*. *Cell and Tissue Research* 188, 497–508.
- Olsen, M. W.; Neher, B. H. 1948: The site of fertilization in the domestic fowl. *Journal of Experimental Zoology* 109 (3), 355–366.
- Parker, H. M.; Yeatman, J. B.; Schultz, C. D.; Zumwalt, C. D.; McDaniel, C. D. 2000: Use of a Sperm Analyzer for Evaluating Broiler Breeder Males. 2. Selection of Young Broiler Breeder Roosters for the Sperm Quality Index Increases Fertile Egg Production. *Poultry Science* 79 (5), 771–777.
- Perry, M. M. 1986: Nuclear events from fertilisation to the early cleavage stages in the domestic cowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Anatomy* 150, 99–109.
- Riaz, A.; Aleem, M.; Ijaz, A.; Saeed, M. A.; Latif, A. 2004: Effect of collection frequency on the semen quality of broiler breeder. *British poultry science* 45 (6), 823–827.
- Robertson, L.; Brown, H. L.; Staines H. J.; Wishart, G. J. 1997: Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *Journal of Reproduction and Fertility* 110, 205–211.
- Robertson, L.; Wilson, Y. I.; Lindsay, C.; Wishart, G. J. 1998: Evaluation of semen from individual male domestic fowl by assessment of sperm perivitelline interaction in vitro and in vivo. *British Poultry Science* 39 (2), 278–281.
- Rodler, D.; Sasanami, T.; Sinowatz, F. 2012: Assembly of the inner perivitelline layer, a homolog of the mammalian zona pellucida: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Cells, tissues, organs* 195 (4), 330–339.
- Russello, M.; Calcagnotto, D.; DeSalle, R.; Amato, G. 2001: Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes* 1.

- Santiago-Moreno, J.; Castaño, C.; Coloma, M. A.; Gómez-Brunet, A.; Toledano-Díaz, A.; López-Sebastián, A.; Campo, J. L. 2009: Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. *Poultry Science* 88 (12), 2661–2669.
- Schnorr, B.; Kressin, M. 2006: *Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch. Kapitel 7: Befruchtung, Fertilisation*, Enke, 36.
- Schramm, G. P. 2005: Künstliche Besamung beim Geflügel. *Züchtungskunde* 77 2/3, 206–217.
- Staines, H. J.; Middleton, R. C.; Laughlin, K. F.; Wishart, G. J. 1998: Quantification of a sperm-egg interaction for estimating the mating efficiency of broiler breeder flocks. *British Poultry Science* 39 (2), 273–277.
- Steele, M.; Meldrum, W.; Brillard, J. P.; Wishart, G. J. 1994: The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility* 101, 599–603.
- Stelzer, G.; Crosta, L.; Bürkle, M.; Krautwald-Junghanns, M. E. 2005: Attempted Semen Collection Using the Massage Technique and Semen Analysis in Various Psittacine Species. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 19 (1), 7–13.
- Stewart, S. G.; Bausek, N.; Wohlrab, F.; Schneider, W. J.; Horrocks, A. J.; Wishart, G. J. 2004: Species specificity in avian sperm:perivitelline interaction. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137 (4), 657–663.
- Win, M. M.; Miyagi, Y.; Ashizawa, K.; Tatemoto, H.; Nakada, T. 2005: In vitro formation of holes on the inner perivitelline layer of quail ovum by chicken spermatozoa. *Animal Science Journal* 76 (2), 133–138.
- Wishart, G. J. 1982: Maintenance of ATP concentrations in and of fertilizing ability of fowl and turkey spermatozoa in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 66 (2), 457–462.
- Wishart, G. J. 1987: Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviducal spermatozoa, as reflected by those trapped in laid eggs. *Journal of Reproduction and Fertility* 80 (2), 493–498.
- Wishart, G. J. 1997: Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. *Animal Reproduction Science* 48, 81–92.
- Wishart, G. J.; Staines, H. J. 1999: Measuring Sperm Egg Interaction to Assess Breeding Efficiency in Chickens and Turkeys. *Poultry Science* 78, 428–436.
- Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H.; Rogers, B. J. 1976: The Use of Zona-Free Animal Ova as a Test-System for the Assessment of the Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 15 (4), 471–476.

9 Anhang

9.1 Versuch 1: Präparationsmodifikation

Tabelle 9.1.1: Ergebnisse der Präparation mit 0,01m HCl bei 60 Minuten Inkubationszeit

Datum	Nr.	Ergebnis
12.04.11	1	Gut separierbar, Löcher sichtbar und dokumentiert
13.04.11	2	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	3	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	4	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	5	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.06.11	7	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	8	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	9	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
18.06.11	10	Gut separiert, innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar

Tabelle 9.1.2: Ergebnisse der Präparation mit 0,01m HCl bei 30 Minuten Inkubationszeit

Datum	Nr.	Ergebnis
12.04.11	1	Gut separiert, Löcher sichtbar, dokumentiert
12.04.11	2	Kaum separiert, nur sehr kleine Membranteile isolierbar, Löcher sichtbar und dokumentiert
13.04.11	3	Gut separiert, Löcher sichtbar, dokumentiert
13.04.11	4	Vollständige Separation, große Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar und dokumentiert
21.06.11	5	Kaum separiert, sehr kleine Membranteile isolierbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	6	Sehr gute Separation, große Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
21.06.11	7	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine

		Löcher sichtbar
21.06.11	8	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	9	Mäßige Separation, kleine innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	10	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.1.3: Ergebnisse der Präparation mit 0,1m HCl bei 60 Minuten Inkubationszeit

Datum	Nr.	Ergebnis
12.04.11	1	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
12.04.11	2	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.04.11	3	Nicht separierbar, Membranteile fädig eingerollt, keine Löcher darstellbar, dokumentiert
13.04.11	4	Nicht separierbar, keine Löcher darstellbar, fädige Strukturen im Präparat, dokumentiert
10.07.11	5	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	7	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	8	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	9	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	10	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.1.4: Ergebnisse der Präparation mit 0,1m HCl bei 30 Minuten Inkubationszeit

Datum	Nr.	Ergebnis
12.04.11	1	Nicht separiert, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
12.04.11	2	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.04.11	3	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar, dokumentiert
13.04.11	4	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	5	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	6	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	7	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	8	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.06.11	9	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.07.11	10	Nicht separierbar, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

9.2 Versuch 2: Haltbarkeitsstudie

Tabelle 9.2.1: Gruppe A: Eier bei Licht und Raumtemperatur gelagert

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/min	Ergebnis
12.04.11	12.04.11	1	60	Gut separiert, Löcher sichtbar, dokumentiert
13.04.11	12.04.11	2	60	Separation gut, Anteile der inneren Perivitellinmembran haften am Boden

				der Petrischale, daher nur kleine Membranteile gewinnbar, Löcher gesehen, dokumentiert
15.04.11	15.04.11	3	60	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
18.04.11	15.04.11	4	60	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
18.04.11	18.04.11	5	60	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
21.04.11	18.04.11	6	60	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
21.04.11	21.04.11	7	90	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
26.04.11	21.04.11	8	90	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
26.04.11	26.04.11	9	90	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar
27.04.11	26.04.11	10	90	Separation nicht möglich, kein innerer Membranteil separierbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.2.2: Gruppe B: Eier bei Dunkelheit und Kühlschranktemperatur gelagert

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/ min	Ergebnis
21.04.11	21.04.11	1	60	Gut separiert, Löcher sichtbar, dokumentiert
26.04.11	21.04.11	2	60	Eiweiß vor der Inkubation schwer von der Dotterkugel ablösbar, keine eiweißfreien Membranteile gewinnbar
26.04.11	24.04.11	3	60	Gut separiert, große Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar, dokumentiert
27.04.11	24.04.11	4	60	Gut separiert, große Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
29.04.11	27.04.11	5	60	Gut separiert, große Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
02.05.11	27.04.11	6	60	Gut separiert, große Membranteile gewinnbar, Löcher nur sehr vereinzelt
02.05.11	02.05.11	7	60	Dotterkugel vor Inkubation beschädigt: kaum separierte Membranteile, keine Löcher
05.05.11	02.5.11	8	60	Mäßige Separation, kleine Membranteile gewinnbar, einzelne Löcher sichtbar
05.05.11	05.05.11	9	60	Keine Separation, keine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
12.05.11	05.05.11	10	60	Keine Separation, keine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.2.3: Gruppe C: Eier bei Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/min	Ergebnis
18.05.11	18.05.11	1	60	Keine Separation, keine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.05.11	18.05.11	2	60	Starke Eiweißkontamination, keine Separation, keine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
25.05.11	21.05.11	3	60	Teilweise Separation, kleine Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
25.05.11	21.05.11	4	60	Teilweise Separation, kleine Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
31.05.11	24.05.11	5	60	Keine Separation, keine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
31.05.11	24.05.11	6	60	Keine Separation, keine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	29.05.11	7	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	29.05.11	8	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	02.06.11	9	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	02.06.11	10	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

9.3 Versuch 3: Bebrütungsversuch

Gruppe I: Befruchtete Eier

Tabelle 9.3.1: Untersuchung der befruchteten Eier vor dem Beginn der Bebrütung (Tag 0)

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
14.07.11	0	1 - 6	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.2: Untersuchung der befruchteten Eier am ersten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
15.07.11	1	1	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
15.07.11	1	2	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
15.07.11	1	3	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
15.07.11	1	4	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
15.07.11	1	5	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
15.07.11	1	6	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.3: Untersuchung der befruchteten Eier am zweiten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
16.07.11	2	1	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar

			bar, keine Löcher sichtbar
16.07.11	2	2	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.07.11	2	3	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.07.11	2	4	Teilweise Separation, kleine innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar, dtl. Dotterkontamination
16.07.11	2	5	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.07.11	2	6	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.4: Untersuchung der befruchteten Eier am dritten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
17.07.11	3	1	KVI, keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
17.07.11	3	2	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
17.07.11	3	3	KVI, keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
17.07.11	3	4	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, Löcher „schimmern durch“ (dokumentiert)
17.07.11	3	5	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
17.07.11	3	6	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

KVI Anmerkung: normales Trennen der Eier nicht möglich, ohne Beschädigung der Dotterkugel, Eröffnung der Eier mittels Skalpellklinge

Tabelle 9.3.5: Untersuchung der befruchteten Eier am vierten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
18.07.11	4	1	KVI, Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.07.11	4	2	Nur Membran inkubiert, Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.07.11	4	3	Nur Membran inkubiert, Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.07.11	4	4	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.07.11	4	5	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
18.07.11	4	6	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

KVI = Dotterkugel kaputt vor Inkubation

Anmerkung: Dotterkugeln können kaum noch unbeschädigt aus dem Ei entnommen werden, es liegt bereits eine deutliche Aderbildung vor (Abb. 9.3.1), bei zwei von sechs Eiern konnte nur die Membran inkubiert werden, da die Dotterkugel beim Entnahmeversuch zu stark beschädigt wurde.



Abbildung 9.3.1: Entwicklung des Embryos bei befruchteten Hühnereiern am fünften Tag nach Beginn der Bebrütung bei 37,7°C und 55% Luftfeuchtigkeit

Tabelle 9.3.6: Untersuchung der befruchteten Eier am fünften Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
19.07.11	5	1-6	Keine Inkubation der Dotterkugeln möglich, da die Perivitellinmembran schon bei vorsichtiger Eröffnung der Schale mittels Skalpellklinge beschädigt wird, da sie an der Schalenhaut haftet. Membran zu fragil, um nur Anteile isolieren und inkubieren zu können.

Tabelle 9.3.7: Untersuchung der befruchteten Eier am sechsten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
20.07.11	6	1-6	Dotterkugel nicht aus dem Ei entnehmbar, Embryo schon deutlich entwickelt, Adergeflecht und Augenanlage erkennbar.

Tabelle 9.3.8: Untersuchung der befruchteten Eier am siebten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
20.07.11	6	1-6	Dotterkugel nicht aus dem Ei entnehmbar, Embryo schon deutlich entwickelt, Adergeflecht und Augenanlage erkennbar.

Tabelle 9.3.9: Untersuchung der beim Schieren als unbefruchtet detektierten Eier

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
21.07.11	7	1	Dotterkugel zerfällt bei Eröffnung der Kalkschale
21.07.11	7	2	KVI, Auflösung der Membran in der Salzsäure, Membran nach der Inkubation nicht mehr auffindbar
21.07.11	7	3	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

KVI = Dotterkugel kaputt vor Inkubation

Gruppe II: Unbefruchtete Eier

Tabelle 9.3.10 Untersuchung der unbefruchteten Eier vor der Bebrütung (Tag 0)

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
20.07.11	0	1 - 6	Vollständige Separation, große innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.11: Untersuchung der unbefruchteten Eier am ersten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
21.07.11	1	1	Vollständige Separation, große innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.07.11	1	2	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.07.11	1	3	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.07.11	1	4	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.07.11	1	5	Vollständige Separation, große innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.07.11	1	6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.12: Untersuchung der unbefruchteten Eier am zweiten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
22.07.11	2	1 - 6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.13: Untersuchung der unbefruchteten Eier am dritten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
23.07.11	3	1 - 6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.14: Untersuchung der unbefruchteten Eier am vierten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
24.07.11	4	1 - 6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.15: Untersuchung der unbefruchteten Eier am fünften Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
26.07.11	5	1 - 6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.16: Untersuchung der unbefruchteten Eier am sechsten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
27.07.11	6	1 - 6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.3.17: Untersuchung der unbefruchteten Eier am siebten Tag der Bebrütung

Datum	Tag der Bebrütung	Nr.	Ergebnis
28.07.11	7	1	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
28.07.11	7	2	Deutliche Eiweißkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
28.07.11	7	3	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
28.07.11	7	4	Dotterkugel vor Inkubation beschädigt, deutliche Eiweißkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
28.07.11	7	5	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
28.07.11	7	6	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

9.4 Versuch 4: Präparation von Eiern anderer Spezies

Tabelle 9.4.1: Falkeiner-Präparation

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/Min	Ergebnis
12.05.11	12.05.11	1	60	Gute Separation, große Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar, dokumentiert
12.05.11	12.05.11	2	60	Keine ausreichende Separation, innere Anteile nicht separierbar, hgr. Dotterkontamination, keine Löcher erkennbar
16.05.11	16.05.11	3	60	Teilweise Separation, kleine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.05.11	16.05.11	4	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.05.11	16.05.11	5	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
06.07.11	06.07.11	6	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
06.07.11	06.07.11	7	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
06.07.11	06.07.11	8	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
06.07.11	06.07.11	9	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
06.07.11	06.07.11	10	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.4.2: Fasaneneier-Präparation

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/Min	Ergebnis
27.05.11	25.05.11	1	60	Teilweise Separation, kleine Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
27.05.11	25.05.11	2	60	Membranen nicht auswertbar aufgrund hochgradiger Eiweißkontamination
31.05.11	27.05.11	3	60	Membranen nicht auswertbar aufgrund hochgradiger Eiweißkontamination
31.05.11	27.05.11	4	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
31.05.11	31.05.11	5	60	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
31.05.11	31.05.11	6	60	Membranen nicht auswertbar aufgrund hochgradiger Eiweißkontamination
22.07.11	21.07.11	7	60	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
22.07.11	21.07.11	8	60	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
22.07.11	21.07.11	9	60	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.4.3: Laufenteneier-Präparation

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/min	Ergebnis
27.05.11	25.05.11	1	30	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
27.05.11	25.05.11	2	30	Gute Separation, große Membranteile gewinnbar, wenige, kleine Löcher sichtbar
31.05.11	27.05.11	3	30	Mäßige Separation, nur sehr kleine innere Membranteile gewinnbar, wenige Löcher sichtbar
31.05.11	27.05.11	4	30	Dotterkugel vor Inkubation beschädigt, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	01.06.11	5	30	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	01.06.11	6	30	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
03.06.11	03.06.11	7	30	Gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, kleine Löcher sichtbar, dokumentiert
03.06.11	03.06.11	8	30	Keine Separation, keine inneren Anteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.06.11	16.06.11	9	30	Kaum Separation, sehr kleine Anteile der inneren Membran gewinnbar, keine Löcher sichtbar
16.06.11	16.06.11	10	30	Sehr gute Separation, große Anteile der IPVM gewinnbar, keine Löcher sichtbar

IPVM= Innere Perivitellinmembran

Tabelle 9.4.4: Wachteleier-Präparation

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/min	Ergebnis
20.07.11	20.07.11	1	60	Sehr gute Separation, große innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
20.07.11	20.07.11	2	60	Mäßige Separation, sehr kleine innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
20.07.11	20.07.11	3	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
20.07.11	20.07.11	4	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
21.07.11	21.07.11	5	60	Mäßige Separation, sehr kleine innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
21.07.11	21.07.11	6	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
22.07.11	22.07.11	7	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
22.07.11	22.07.11	8	60	Mäßige Separation, sehr kleine innere Membranteile gewinnbar, Löcher sichtbar
24.07.11	24.07.11	9	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
24.07.11	24.07.11	10	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Lö-

				cher sichtbar
--	--	--	--	---------------

Tabelle 9.4.5: Gänseeier-Präparation

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/Min	Ergebnis
10.10.11	06.10.11	1	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	2	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	3	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	4	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	5	60	Dotterkugel vor Inkubation beschädigt, Schimmel auf der inneren Schalenfläche, hochgradige Eiweiß- und Dotterkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	6	60	Adergeflecht sichtbar, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	7	60	Mittelgradige Eiweißkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	8	60	Dotterkugel vor Inkubation beschädigt, Schimmel auf der Inneren Scha-

				lenfläche, hochgradige Dotterkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	9	60	Adergeflecht sichtbar, Dotterkugel vor Inkubation beschädigt, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
10.10.11	06.10.11	10	60	hochgradige Dotterkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

Tabelle 9.4.6: Nymphensitticheier-Präparation

Datum Auswertung	Datum Inkubation	Nr.	Inkubationszeit/Min	Ergebnis
13.12.11	12.12.11	1	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	2	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	3	60	Dotterkugel vor Inkubation sehr trüb, deutliche Eiweißkontamination, keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	4	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	5	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

13.12.11	12.12.11	6	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	7	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	8	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	9	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar
13.12.11	12.12.11	10	60	Keine Separation, keine inneren Membranteile gewinnbar, keine Löcher sichtbar

9.5 Versuch 5: Perivitellinmembran-Penetrationstest

Tabelle 9.5.1: Parameter des Nativ-Spermas Hahn

Datum	Ejakulatnr.	Anz. Tiere	pH	Vol. (µl)	Dichte	Beimengungen	Massenbew.	Verdünnung	Menge µl/Probe
07.02.2013	1	2	7,5	58	50.000	Erys (+), Epi-thelzellen +++	- - ++	1:1 Semaïd	4
12.02.2013	2	3	7,8	68	20.000	keine	(+) - +	1:1 Semaïd	12
14.02.2013	3	4	7,4	141	200.000	keine	(+) bis +++	1:2 Semaïd	20
19.02.2013	4	1	7,2	85	50.000	keine	+ - ++	1:1 Semaïd	6
28.02.2013	5	2	8	90	105.000	keine	+ - +++	1:1 Semaïd	10
19.03.2013	6	2	8	85	150.000	keine	++ - +++	1:1 Semaïd	20
03.04.2013	7	1	7,2	110	70.000	keine	++	1:1 Semaïd	20
09.04.2013	8	3	7,2	140	97.500	keine	+ - +++	1:1 Semaïd	22
17.04.2013	9	3	7,2	175	85.000	keine	+ - ++	1:1 Semaïd	20
21.04.2013	10	2	7,5	50	315.000	keine	+++	1:1 Semaïd	10

Tabelle 9.5.2: Ergebnisse der In-vitro_Penetration von Hühner-IPVM mit nativem Hahnenejakulat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kontrolle
Hahn 1	8	5	3	7	0	11	7	2	3	2	0
Hahn 2	NA	0	2	1	2	2	10	3	0	0	0
Hahn 3	49	29	16	6	26	22	28	34	10	19	0
Hahn 4	17	13	35	19	21	30	24	NA	18	35	0
Hahn 5	NA	0	0	0	2	0	0	29	0	0	0
Hahn 6	0	22	0	NA	0	0	4	3	1	3	0
Hahn 7	54	33	27	34	37	41	5	53	NA	NA	0
Hahn 8	0	0	1	2	0	10	0	0	0	0	0
Hahn 9	74	NA	> 300	140	> 300	21	> 300	> 300	> 300	97	0
Hahn 10	13	31	16	10	22	43	11	18	32	23	0
Hahn 11	119	109	15	157	99	> 300	53	48	100	>300	0

NA= Präparat nicht auswertbar

Tabelle 9.5.3: Untersuchungsparameter des Tiefgefrierspermas Hahn

Datum	Nr.	Dichte Mio/μl	Massenbewegung	μl/ Prä- parat
28.05.2013	1	1,2	+++	2
05.06.2013	2	1,2	+++	2
05.06.2013	3	1,2	+++	2
31.07.2013	4	1,2	+++	2
31.07.2013	5	1,2	+++	2
06.08.2013	6	1,2	+++	2
14.08.2013	7	1,2	+++	2
15.08.2013	8	1,2	+++	2
15.08.2013	9	1,2	+++	2
19.08.2013	10	1,2	+++	2

Tabelle 9.5.4: Ergebnisse der In-vitro-Penetration von Hühner-PVM mit Hahnen-Tiefgefrier-Sperma

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kontrolle
Ejakulat 1	5	44	56	87	217	106	98	>300	>300	27	0
Ejakulat 2	NA	167	>300	205	126	157	176	48	26	39	0
Ejakulat 3	81	53	135	130	NA	86	0	16	96	123	0
Ejakulat 4	136	69	56	82	NA	NA	NA	48	67	71	0
Ejakulat 5	0	0	0	0	0	0	9	83	14	79	0
Ejakulat 6	79	123	220	60	129	212	19	0	0	>300	0
Ejakulat 7	10	5	>300	NA	128	157	52	87	232	77	0
Ejakulat 8	>300	5	9	7	205	130	82	213	93	166	0
Ejakulat 9	122	27	102	58	256	118	16	261	19	96	0
Ejakulat 10	133	9	162	126	31	53	23	42	61	44	0

NA= Präparat nicht auswertbar

Tabelle 9.5.5: Parameter der verwendeten Falken-Ejakulate

Datum	Spezies	Ejaku- latnr.	Anz. Tiere	pH	Vol. (µl)	Dichte	Beimengun- gen	Massen- bew.	Verdün- nung	Menge µl/Probe
21.04.2013	Falke	1	2	7	50	110.000	keine	+++	1:1 Semaïd	20
24.04.2013	Falke	2	1	7,4	16	95.000	keine	+++	1:1 Semaïd	6
30.04.2013	Falke	3	1	7,2	8	50.000	keine	++	1:1 Semaïd	3
01.05.2013	Falke	4	2	k.A.	22	24.500	+ Urate	+ - +++	1:1 Semaïd	8
03.05.2013	Falke	5	1	k.A.	4	5.000	+++ RB	+	1:1 Semaïd	1,5
03.05.2013	Falke	6	1	k.A.	16	5.000	++ RB, '+ Urate	++	keine	3
08.05.2013	Falke	7	1	k.A.	25	5.500	+ RB	+ - ++	keine	5
14.05.2013	Falke	8	1	k.A.	9	5.500	+++ RB	++	keine	1,5
16.05.2013	Falke	9	1	k.A.	5	3.000	++ RB	+	keine	1
20.05.2013	Falke	10	2	k.A.	20	8.000	** RB	++	keine	4

k.A. = keine Angabe

RB = round bodies

Tabelle 9.5.6: Ergebnisse der In-vitro-Penetration von Hühner-PVM mit Falken-Ejakulat

	1	2	3	4	5	Kontrolle
Falke 1	0	0	0	0	0	0
Falke 2	0	0	0	0	0	0
Falke 3	0	0	0	0	0	0
Falke 4	0	0	NA	0	0	0
Falke 5	0	0	0	0	0	0
Falke 6	0	0	0	0	0	0
Falke 7	0	0	0	0	0	0
Falke 8	0	0	0	0	0	0
Falke 9	0	0	0	0	0	0
Falke 10	0	0	0	0	0	0

NA = Präparat nicht auswertbar

Tabelle 9.5.7: Parameter der verwendeten Nativejakulate von Nymphensittichen

Datum	Spezies	Ejakulatnr.	Anz. Tiere	Vol. (µl)	Dichte	Beimengungen	Massenbew.	Verdünnung	Menge µl/Probe
16.05.2013	Nymphensittich	1	10	16,4	64.000	Keine	+++ - ++	1:1 Nymphhi	3
28.05.2013	Nymphensittich	2	10	21	74.000	Keine	++	1:1 Nymphhi	4
05.06.2013	Nymphensittich	3	10	12	340.000	Keine	++	1:3 Nymphhi	4
20.06.2013	Nymphensittich	4	10	14	805.000	Keine	+++	1:2 Nymphhi	4
27.06.2013	Nymphensittich	5	10	17,9	877.500	Keine	+ - +++	1:1 Nymphhi	3
02.07.2013	Nymphensittich	6	10	20	810.000	Keine	++ - +++	1:1 Nymphhi	4
04.07.2013	Nymphensittich	7	10	13	480.000	Keine	++	1:1 Nymphhi	2
31.07.2013	Nymphensittich	8	10	15	800.000	Keine	+ - +++	1:1 Nymphhi	3
06.08.2013	Nymphensittich	9	10	11,5	600.000	Keine	+ - ++	1:1 Nymphhi	2
09.08.2013	Nymphensittich	10	10	10	395.000	Keine	+++	1:1 Nymphhi	2

Tabelle 9.5.8: Ergebnisse der In-vitro-Penetration von Hühner-PVM mit Nymphensittich-Ejakulat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kontrolle
Nymphensittich 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 2	NA	14	7	11	28	46	24	39	57	0	0
Nymphensittich 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nymphensittich 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NA: Präparat nicht auswertbar

9.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2.4.1: Auswahl in der Literatur verwendeter hypotonischer Lösungen für den HOS-Test an Vogelspermien	9
Tabelle 4.1.1 Ergebnisse der Präparation nach verschiedenen Protokollen mit Variation der Säurekonzentration und Inkubationszeit bei unbebrüteten Hühnereiern	24
Tabelle 4.2.1: Ergebnisse der Haltbarkeitsstudie: Auswirkung von Umgebungstemperatur, Lichteinwirkung und Lagerungsdauer auf den Separationserfolg bei Hühnereiern.	25
Tabelle 4.3.1 Ergebnisse der Separation befruchteter Hühnereier nach Inkubation bei 37,7°C und 55% Luftfeuchtigkeit	26
Tabelle 4.3.2 Untersuchung der Eier, die beim Schieren an Tag 6 nach der Bebrütung als unbefruchtet detektiert waren	26
Tabelle 4.3.3: Ergebnisse der Separation unbefruchteter Hühnereier nach Inkubation bei 37,7°C und 55% Luftfeuchtigkeit.....	27
Tabelle 4.4.1 Separationserfolg bei Eiern anderer Vogelspezies	27
Tabelle 4.5.1: Ergebnisse des Perivitellinmembran-Penetrationstests mit nativem Hahnenejakulat.....	28
Tabelle 4.5.2.1: Ergebnisse des Perivitellinmembran-Penetrationstests mit Tiefgefrier-Sperma von Hähnen	31
Tabelle 4.5.3: Ergebnisse des Perivitellinmembran-Penetrationstests mit Nymphensittich-Ejakulat	33
Tabelle 9.1.1: Ergebnisse der Präparation mit 0,01m HCl bei 60 Minuten Inkubationszeit.....	54
Tabelle 9.1.2: Ergebnisse der Präparation mit 0,01m HCl bei 30 Minuten Inkubationszeit.....	54
Tabelle 9.1.3: Ergebnisse der Präparation mit 0,1m HCl bei 60 Minuten Inkubationszeit.....	55
Tabelle 9.1.4: Ergebnisse der Präparation mit 0,1m HCl bei 30 Minuten Inkubationszeit.....	56
Tabelle 9.2.1: Gruppe A: Eier bei Licht und Raumtemperatur gelagert	56
Tabelle 9.2.2: Gruppe B: Eier bei Dunkelheit und Kühlschranktemperatur gelagert .	58

Tabelle 9.2.3: Gruppe C: Eier bei Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert.....	59
Tabelle 9.3.1: Untersuchung der befruchteten Eier vor dem Beginn der Bebrütung (Tag 0).....	60
Tabelle 9.3.2: Untersuchung der befruchteten Eier am ersten Tag der Bebrütung...	60
Tabelle 9.3.3: Untersuchung der befruchteten Eier am zweiten Tag der Bebrütung	60
Tabelle 9.3.4: Untersuchung der befruchteten Eier am dritten Tag der Bebrütung...	61
Tabelle 9.3.5: Untersuchung der befruchteten Eier am vierten Tag der Bebrütung..	62
Tabelle 9.3.6: Untersuchung der befruchteten Eier am fünften Tag der Bebrütung..	63
Tabelle 9.3.7: Untersuchung der befruchteten Eier am sechsten Tag der Bebrütung	64
Tabelle 9.3.8: Untersuchung der befruchteten Eier am siebten Tag der Bebrütung .	64
Tabelle 9.3.9: Untersuchung der beim Schieren als unbefruchtet detektierten Eier .	64
Tabelle 9.3.10 Untersuchung der unbefruchteten Eier vor der Bebrütung (Tag 0) ...	65
Tabelle 9.3.11: Untersuchung der unbefruchteten Eier am ersten Tag der Bebrütung	65
Tabelle 9.3.12: Untersuchung der unbefruchteten Eier am zweiten Tag der Bebrütung.....	66
Tabelle 9.3.13: Untersuchung der unbefruchteten Eier am dritten Tag der Bebrütung	66
Tabelle 9.3.14: Untersuchung der unbefruchteten Eier am vierten Tag der Bebrütung	66
Tabelle 9.3.15: Untersuchung der unbefruchteten Eier am fünften Tag der Bebrütung	66
Tabelle 9.3.16: Untersuchung der unbefruchteten Eier am sechsten Tag der Bebrütung.....	67
Tabelle 9.3.17: Untersuchung der unbefruchteten Eier am siebten Tag der Bebrütung	67
Tabelle 9.4.1: Falkeiner-Präparation	68
Tabelle 9.4.2: Fasaneneier-Präparation	69
Tabelle 9.4.3: Laufenteneier-Präparation	70
Tabelle 9.4.4: Wachteleier-Präparation	71
Tabelle 9.4.5: Gänseeier-Präparation.....	72
Tabelle 9.4.6: Nymphensitticheier-Präparation.....	73
Tabelle 9.5.1: Parameter des Nativ-Spermas Hahn	75

Tabelle 9.5.2: Ergebnisse der In-vitro_Penetration von Hühner-IPVM mit nativem Hahnenejakulat.....	76
Tabelle 9.5.3: Untersuchungsparameter des Tiefgefrierspermas Hahn	77
Tabelle 9.5.4: Ergebnisse der In-vitro-Penetration von Hühner-PVM mit Hahnen-Tiefgefrier-Sperma.....	78
Tabelle 9.5.5: Parameter der verwendeten Falken-Ejakulate	79
Tabelle 9.5.6: Ergebnisse der In-vitro-Penetration von Hühner-PVM mit Falken-Ejakulat.....	80
Tabelle 9.5.7: Parameter der verwendeten Nativejakulate von Nymphensittichen ...	81
Tabelle 9.5.8: Ergebnisse der In-vitro-Penetration von Hühner-PVM mit Nymphensittich-Ejakulat	82

9.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1.2.1.1: Waschen der Dotterkugel mit 1% NaCl nach Entnahme aus der Eierschale.....	12
Abbildung 3.1.2.1.2: Inkubation der Dotterkugel in 0,01mol HCl	13
Abbildung 3.1.2.1.3: Separation der inneren von der äußeren Perivitellinmembran unter dem Stereomikroskop.....	14
Abbildung 4.5.1: Korrelationsdiagramm zwischen der Standardabweichung s der Lochzahl und dem Mittelwert \bar{x} der Lochzahl bei der Auswertung der nativen Hahnen-Ejakulate.....	29
Abbildung 4.5.2.1: Durch TG-Hahnersperma entstandene Hydrolyse-Löcher in der IPVM von Hühnereiern	30
Abbildung 9.3.1: Entwicklung des Embryos bei befruchteten Hühnereiern am fünften Tag nach Beginn der Bebrütung bei 37,7°C und 55% Luftfeuchtigkeit	63

Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, August 2015

Judith Krohn

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Axel Wehrend für die Betreuung der vorliegenden Arbeit, besonders für die immer zeitnahen Korrekturen und die stetige Motivation.

Zusätzlich gilt mein ganz besonderer Dank Helena Schneider und Dominik Fischer aus der Vogelklinik, für die Gewinnung der Ejakulate und die Spermauntersuchungen, die vielen freiwilligen Planungs- und Beratungsgespräche und die großartige Unterstützung! Ohne euch hätte dieses Projekt so nicht stattgefunden.

Mein Dank gilt ebenso Simone Heerdt für die Einführung in den praktischen Teil der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Failing und Frau Sparrenberg aus der AG Biomathematik für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Vielen Dank auch Malte und meiner Familie, dass ihr mich bei diesem Projekt unterstützt, motiviert und immer daran geglaubt habt, dass es zu einem guten Abschluss kommt!

